

# **Charakterisierung rekombinanter immunreaktiver Antigene der Krätzmilbe *Sarcoptes scabiei***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Carola Kuhn, geb. von Witzendorff  
geb. 30.04.1972 in Hannover

Präsident der Humboldt-Universität  
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. T. Buckhout, PhD

1. Gutachter: Prof. R. Lucius
2. Gutachter: Prof. T. Schnieder
3. Gutachter: Prof. W. Presber

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2005

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines von der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ (AiF) geförderten Projektes (Förderungskennzeichen KF 0185602KUL1) durchgeführt.

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>10</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>1.1     <i>Sarcoptes scabiei</i></b>	<b>11</b>
1.1.1   Der Erreger	11
1.1.2   Biologie	11
1.1.3   Wirtsspezifität	13
1.1.4   Vorkommen	14
1.1.5   Pathogenese und Klinik	15
<b>1.2     Bedeutung der <i>Sarcoptes</i>-Infektion</b>	<b>16</b>
<b>1.3     Therapie</b>	<b>16</b>
<b>1.4     Immunologie</b>	<b>19</b>
1.4.1   Immunreaktive <i>Sarcoptes</i> -Antigene	19
1.4.2   Immunantwort bei einer <i>Sarcoptes</i> -Infektion	19
1.4.3   Kreuzreaktionen zwischen <i>S. scabiei</i> und anderen Milben	22
<b>1.5     Diagnostik von <i>Sarcoptes</i>-Infektionen</b>	<b>23</b>
1.5.1   Konventionelle Diagnostik	23
1.5.2   Nachweis von <i>Sarcoptes</i> -DNA	24
1.5.3   Serodiagnostik	24
<b>1.6     Serodiagnostik von Parasiten unter Verwendung rekombinanter Antigene</b>	<b>25</b>
<b>1.7     Molekularbiologische Studien mit <i>S. scabiei</i></b>	<b>27</b>
<b>1.8     Ziel dieser Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>2     MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>2.1     Material</b>	<b>29</b>
2.1.1   Parasiten- und Tiermaterial	29
2.1.2   Laborgeräte	29
2.1.3   Einwegartikel	30
2.1.4   Mehrwegartikel	31
2.1.5   Reagenzien	31

2.1.6	Kommerzielle Kits und Standards	33
2.1.7	Enzyme	34
2.1.8	Seren und Antikörper	35
2.1.9	Primer	36
2.1.10	Synthetische Peptide	38
2.1.11	Vektoren, cDNA-Banken und <i>E. coli</i> -Stämme	38
2.1.11.1	Expressionsvektoren	38
2.1.11.2	cDNA-Bank	38
2.1.11.3	<i>E. coli</i> -Stämme	38
2.1.12	Lösungen und Puffer	39
2.1.12.1	Agarosegel-Elektrophorese Puffer	39
2.1.12.2	Antibiotika	39
2.1.12.3	Bakterien-Kulturmedien	40
2.1.12.4	SDS-PAGE	40
2.1.12.5	Immunoscreening, Western Blot	41
2.1.12.6	RNA-Isolierung und Reverse Transkription	42
2.1.12.7	Isolierung genomischer DNA	42
2.1.12.8	DNA-Hybridisierung	42
2.1.12.9	Proteaseinhibitoren	43
2.1.12.10	Löslichkeitstest und Ni-NTA-Affinitätschromatographie	43
2.1.12.11	Dialyse	44
2.1.12.12	GST-Affinitätschromatographie	44
2.1.12.13	ELISA	44
2.1.12.14	Deglykosilierung von SsGesamtantigen	45
2.1.12.15	Ellmann's Assay	45
2.1.12.16	Immunisierung der BALB/c-Mäuse	46
2.1.12.17	Immunhistochemie	46
2.1.12.18	Elektronenmikroskopie	46
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>48</b>
2.2.1	Gewinnung von Parasitenmaterial	48
2.2.1.1	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>suis</i> und <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	48
2.2.1.2	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>bovis</i>	48
2.2.1.3	Herstellung von Antigenextrakt	48
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.2.1	RNA-Isolierung	49
2.2.2.2	Integrität der Gesamt-RNA	49
2.2.2.3	Reverse Transkription der <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> -mRNA	50
2.2.2.4	cDNA-Bank	50
2.2.2.5	Isolierung und Restriktion genomischer DNA	51



2.2.2.6	Primer-Design	51
2.2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.2.2.8	Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)	55
2.2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Fragmenten	56
2.2.2.10	Isolation von DNA-Fragmenten	56
2.2.2.11	Isolation von Plasmid-DNA	57
2.2.2.12	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	57
2.2.2.13	Restriktionsverdau von Vektoren und DNA-Fragmenten	57
2.2.2.14	Ligation von DNA	58
2.2.2.15	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	59
2.2.2.16	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien mit Plasmid-DNA	59
2.2.2.17	Identifizierung positiver Transformanden	60
2.2.2.18	Langzeitlagerung von Bakterienstocks	61
2.2.2.19	Sequenzanalyse	61
2.2.2.20	Datenbank-Abgleich	61
2.2.2.21	Identifizierung von Signalpeptiden	62
2.2.2.22	<i>in vivo</i> -Exzision	62
2.2.2.23	Expression der Gene in Flüssigkultur	63
2.2.2.24	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	66
2.2.2.25	SDS-PAGE	66
2.2.2.26	Coomassie-Färbung	67
2.2.2.27	DNA-Hybridisierung	68
2.2.2.28	Southern Blot	69
2.2.3	Biochemische Methoden	71
2.2.3.1	Synthetische Peptide	71
2.2.3.2	Kopplung der Peptide an KLH	71
2.2.3.3	Quantifizierung der Konjugation durch den Ellmann's Assay	71
2.2.3.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	72
2.2.4	Immunologische Methoden	73
2.2.4.1	Präabsorption der Seren	73
2.2.4.2	Immunoscreening	73
2.2.4.3	Detektion <i>Sarcoptes</i> -spezifischer Klone im Dot Blot	75
2.2.4.4	Western Blot	76
2.2.4.5	Dialyse von harnstoffhaltigen Proteinlösungen	77
2.2.4.6	ELISA	78
2.2.4.7	Deglykosilierung von SsGesamtantigen	79
2.2.4.8	Immunisierung von BALB/c-Mäusen	80
2.2.4.9	Immunhistochemie	80
2.2.5	Statistische Analyse	83

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>84</b>
3.1	Reaktion der humanen Patientenseren mit <i>Ss</i> Gesamtantigen im ELISA	84
3.2	Reaktion der Schweineseren mit <i>Ss</i> Gesamtantigen im ELISA	85
3.3	Reaktion der humanen Patientenseren mit <i>Ss</i> Gesamtantigen im Western Blot	85
3.4	Antikörperantwort der Patienten gegen deglykosiliertes <i>Ss</i> Gesamtantigen	86
3.5	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Sarcoptes scabiei</i>	87
3.6	cDNA-Phagen-Bank in $\lambda$ TriplEx2	87
3.7	Immunoscreening	88
3.7.1	Insertionsgrößen der isolierten immunreaktiven Klone	88
3.8	Auswahl von <i>Sarcoptes</i> -spezifischen Klonen	88
3.9	Charakterisierung, Expression und Aufreinigung der immunreaktiven Antigene	91
3.9.1	Antigene ohne repetitive Domänen	92
3.9.1.1	Klon <i>Ss</i> -4	92
3.9.1.2	Klon <i>Ss</i> -7	94
3.9.1.3	Klon <i>Ss</i> -17	96
3.9.1.4	Klon <i>Ss</i> -37	99
3.9.2	Antigene mit repetitiven Domänen	103
3.9.2.1	Klon <i>Ss</i> -23	103
3.9.2.2	Klon <i>Ss</i> -97	106
3.9.2.3	Klon <i>Ss</i> -134	108
3.9.2.4	„KE-reiche Antigene“-kodierende Klone	111
3.10	Immundiagnostisches Potenzial der rekombinanten Antigene	129
3.10.1	Klon <i>Ss</i> -4	129
3.10.2	Klon <i>Ss</i> -7	131
3.10.3	Klon <i>Ss</i> -17	132
3.10.4	Klon <i>Ss</i> -18	133
3.10.5	Klon <i>Ss</i> -23	136
3.10.6	Klon <i>Ss</i> -37	138
3.10.7	Klon <i>Ss</i> -97	139

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>142</b>
4.1	Parasitenmaterial	142
4.2	Reaktion der Patientenseren mit SsGesamtantigen	143
4.3	RNA-Isolierung und Klone aus der cDNA-Bank	145
4.4	Expression der rekombinanten Antigene	148
4.5	Antigenität und potenzielle Funktionen der isolierten Antigene	150
4.6	Charakterisierung der für die „KE-reichen Antigene-kodierenden Sequenzen	160
4.6.1	Genkopien und Transkripte	160
4.6.2	Lokalisierung der „KE-reichen Antigene“	162
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>166</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>185</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	185
7.2	Symbole für Aminosäuren	187
7.3	Buchstabencode mehrdeutiger Nukleotide (Wobbles)	187
7.4	Sequenzen der charakterisierten Klone	188
7.4.1	Klon Ss-4	188
7.4.2	Klon Ss-7	189
7.4.3	Klon Ss-14	190
7.4.4	Klon Ss-17	191
7.4.5	Klon Ss-18	192
7.4.6	Klon Ss-23	193
7.4.7	Klon Ss-37	194
7.4.8	Klon Ss-97	195
7.4.9	Klon Ss-134	196
7.4.10	GA-Sonde	196
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>197</b>

<b>LEBENS LAUF</b>	<b>198</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>199</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>200</b>

## Zusammenfassung

Die parasitische Milbe *Sarcoptes scabiei*, die im *Stratum corneum* ihres Wirtes lebt, ist weit verbreitet. Eine zuverlässige Diagnose mittels herkömmlicher Techniken ist unzulänglich. Serologische Tests unter Verwendung von Gesamtantigenen sind aufwändig und teuer in der Herstellung, und Kreuzreaktionen mit freilebenden Milben können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Von dem Einsatz spezifischer rekombinanter Antigene ist eine Verbesserung der Serodiagnostik zu erwarten.

In dieser Arbeit wurde eine cDNA-Bank aller Entwicklungsstadien von *S. scabiei* var. *suis* erstellt. Unter Verwendung eines humanen Skabies-positiven Sammelserums wurden 61 rekombinante immunreaktive Klone von *S. scabiei* isoliert, und das Protein von sieben dieser Klone als Diagnostikkandidaten wurde aufgereinigt. Die identifizierten Sequenzen zeichnen sich z. T. durch das Vorhandensein repetitiver Bereiche aus. Die rekombinanten Proteine wurden im ELISA unter Verwendung von Human- und Schweineseren auf ihre Sensitivität geprüft. Die Antigene zeigten signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen mit den humanen Positiv- bzw. Negativseren, während dies bezüglich der Reaktion mit den porcinen Seren, nur für vier der Antigene der Fall war. Unspezifische Reaktionen mit *E. coli*-Protein sowie GST bei einem als Fusionsprotein exprimierten Antigen erwiesen sich als störend.

42.6% der isolierten Klone enthalten eine repetitive zentrale Region, deren offener Leserahmen hauptsächlich für die Aminosäuren Glutamat und Lysin kodiert. Obwohl sie große Homologien aufweisen, unterscheiden sich die Transkripte sowohl im zentralen Bereich als auch am 3'-Ende voneinander. Mittels der Southern Blot-Analyse konnte in *Sarcoptes* nur eine Genkopie detektiert werden, während dieses Gen in *Dermatophagoides*-Milben nicht nachgewiesen werden konnte. Auf Grund der Spezifität des Antigens für die parasitischen Milben könnte dieses Antigen für die Serodiagnostik besonders geeignet sein. Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen wurden entsprechende Proteine in einer Organstruktur, bei der es sich vermutlich um die Hoden der Milben handelt, detektiert.

In dieser Arbeit wurden rekombinante Antigene für die Serodiagnostik der *Sarcoptes*-Infektion bereitgestellt. Es wurde gezeigt, dass das Expressionssystem *E. coli* als Produktionssystem rekombinanter Antigene für die Serodiagnostik von *Sarcoptes*-Infektionen möglicherweise ungeeignet ist.

## Summary

The parasitic mite *Sarcoptes scabiei*, which lives in the *Stratum corneum* of the host, is prevalent worldwide. Reliable diagnosis using conventional methods is unsatisfying. Serological tests using the total antigen are labour intensive and expensive to produce, and moreover there exist unspecific crossreactions against house dust mites, which lead to false positive results. We expect an improvement of serological diagnosis using specific recombinant antigens of the *Sarcoptes*-mites.

In this work, we constructed a cDNA-library of all stages from *S. scabiei* var. *suis*. Using scabies-positive pooled human sera, we isolated 61 recombinant immunoreactive clones and purified the protein of seven clones as potential candidates for diagnosis. The identified sequences are partially characterized by the presence of repetitive domains. The recombinant proteins were tested for their sensitivity in the ELISA, using positive and negative human- and porcine sera. There exist significant differences between the reactions of the positive and negative sera for all the seven antigens using human sera. In contrast, with the porcine sera, significant difference could be detected only in four antigens. Reactions against of *E. coli*-protein and the GST in the fusionprotein caused problems of unspecific background.

42.6% of the isolated clones contain a repetitive central region, and the ORF mainly encodes the aminoacids glutamate and lysine. Although there exist high homologies, the sequences of the transcripts differ in the central region and at the 3'-end. By southern blot analysis we could show one copy of the gene, while it was not detected in the genome of the free-living *Dermatophagoides*-mites. As for the specificity for the parasitic mites, the antigens might be good candidates for immunodiagnosis. In immunohistochemical studies the proteins were detected in a paired structure in the posterior part of the mites opisthosoma, which might be the testis.

In this study, recombinant antigens of *S. scabiei* were produced and tested for the use in immunodiagnosis. It was shown, that the *E. coli*-expression system might be unsuitable for the production of recombinant antigens for their use in immunodiagnosis of *Sarcoptes*-infections.

## Einleitung

### 1.1 *Sarcoptes scabiei*

#### 1.1.1 Der Erreger

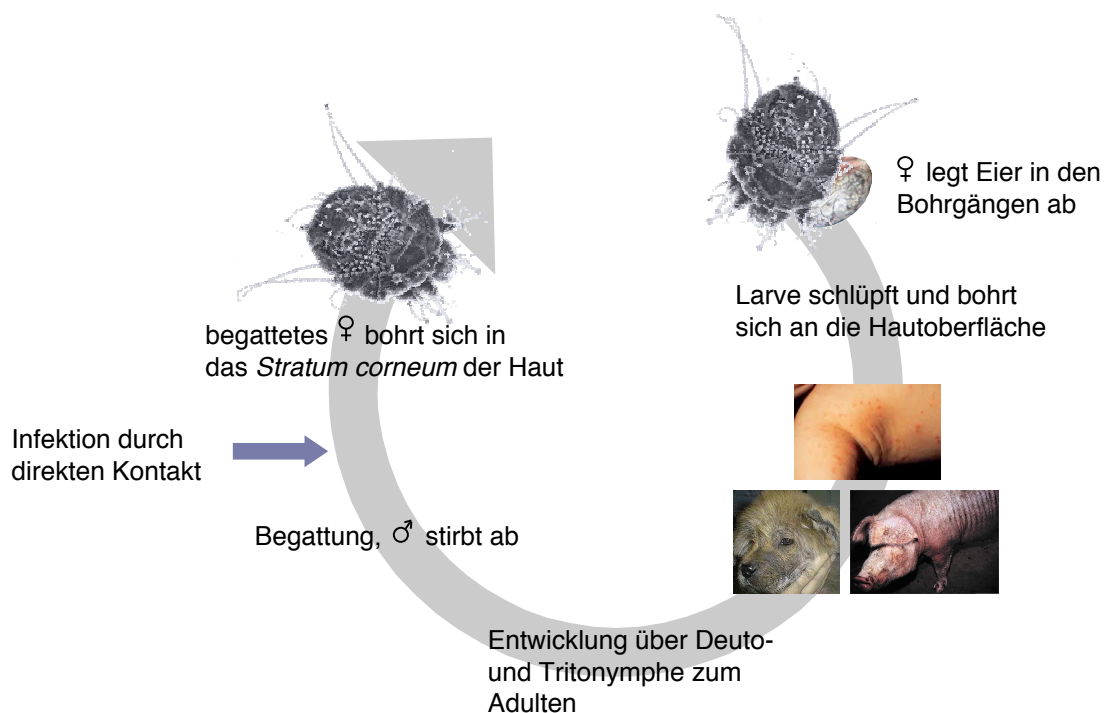
Der Parasit *Sarcoptes scabiei* ist eine pathogene Milbe, die sowohl beim Menschen als auch beim Tier auftritt. Sie lebt im *Stratum corneum* der Haut ihres Wirtes (Head et al. 1990) und ist taxonomisch in die Klasse der Arachnida und die Familie der Sarcoptidae (Krätzmilben) einzuordnen (Übersicht Burgess 1994, McCarthy et al. 2004). Zusammen mit den Acaridae und Glycyphagidae (Staubmilben) sowie den Psoroptidae (Räudemilben) bilden diese sowohl in veterinär- als auch humanmedizinischer Hinsicht bedeutenden Parasiten die Gruppe der Astigmata, die sich durch das Fehlen der Atemöffnungen (Stigmen) auszeichnet.

Die *Sarcoptes*-Milben besitzen eine breite, ovale Form, deren Oberfläche mit Stacheln, Borsten und Haaren besetzt ist. Die weiblichen Milben messen zwischen 300 und 500 µm Länge, während die Männchen mit 213-285 µm wesentlich kleiner sind. Sie haben damit die gleiche Größe wie die Nymphenstadien, unterscheiden sich von diesen allerdings durch ihre dunklere Farbe (Walton et al. 2004). Der Anus liegt bei beiden Geschlechtern terminal. Die Geschlechtsöffnung der Weibchen befindet sich in Form eines transversalen Schlitzes ventral zwischen den anterioren und den posterioren Beinpaaren, während sich die der Männchen in der ventralen Mittellinie zwischen dem Anus und den fusionierten Epimeren der Beine III und IV befindet. Die kurzen Beine sind mit ungegliederten, gestielten Haftscheiben ausgestattet (Übersicht Burgess 1994).

#### 1.1.2 Biologie

Bei den *Sarcoptes*-Milben handelt es sich um permanente Ektoparasiten von Warmblütern, deren Wirtsspezifität in der Mehrheit der Fälle außerordentlich hoch ist. Der gesamte Lebenszyklus wird auf dem Wirt durchlaufen. Eine Infektion des Wirtes erfolgt durch direkten Kontakt und damit der Übertragung eines begatteten Weibchens, das sich sofort in das *Stratum corneum* der Haut einbohrt. Hier legt es Bohrgänge mit einer Geschwindigkeit von 0.5 bis 5 mm pro Tag an (Übersicht

Burgess 1994). In einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen findet in diesen Gängen die Ablage von ein bis drei Eiern täglich durch das befruchtete Weibchen statt. Nach etwa drei bis vier Tagen schlüpfen aus den Eiern Larven, die an die Hautoberfläche dringen und nach etwa 9-14 (Männchen) bzw. 12-21 (Weibchen) Tagen die Geschlechtsreife erlangen (Robert-Koch-Institut 2000). Während dieser Entwicklung durchlaufen die Milben zwei Nymphenstadien, das der Proto- und der Tritonymphe, die in kleinen Bohrtaschen an der Hautoberfläche leben. Auf der Hautoberfläche findet auch die Begattung statt, nach der die Männchen absterben. Der Zyklus schließt sich durch das Einbohren der Weibchen in das *Stratum corneum*. Alle Stadien penetrieren die intakte Epidermis durch die Sekretion von Verdauungsenzymen und die anschließende Ingestion (McCarthy et al. 2004). Die Milben können 24-36 h bei Raumtemperatur getrennt von ihrem Wirt überleben und ihre Infektiösität beibehalten (Arlan et al. 1989). Der Lebenszyklus der *Sarcoptes*-Milben ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.



**Abb. 1: Lebenszyklus von *Sarcoptes scabiei***



Prädilektionsstellen der Milben sind bei Erwachsenen die Interdigitalräume und Handgelenke, die Axillarregionen, der Nabel-, Becken- und Gesäßbereich, die Fußgelenke, und der Penis sowie bei Frauen die Region um die Brustwarzen. Bei Kindern oder allen Patienten in tropischen Ländern treten die Milben verstärkt an den Handinnenflächen, Fußsohlen, in Gesicht und Hals sowie auf der Kopfhaut auf (McCarthy et al. 2004). Prädilektionsstellen beim Schwein sind im Allgemeinen das Ohr und die äußere Ohrmuschel (Davis und Moon 1990).

### 1.1.3 Wirtsspezifität

Die Art *Sarcoptes scabiei* wird in der Literatur als eine heterogene Art, die sich aus verschiedenen Varietäten zusammensetzt, beschrieben (Übersicht Burgess 1994, Übersicht Arlian 1996, Zahler et al. 1999). Die Varietäten von unterschiedlichen Wirten zeigen wenige morphologische Unterschiede, und auch genetische Untersuchungen an dem Internal Transcribed Spacer 2 (ITS-2) des rRNA Gens verschiedener Isolate wiesen auf die Existenz einer Art hin (Zahler et al. 1999). Andere Untersuchungen der ribosomalen DNA und des 16S mitochondrialen rRNA Gens zeigten zwar Differenzen zwischen lokalen *Sarcoptes*-Isolaten der Ziege und des Fuchses, allerdings konnte die Differenzierung nicht in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Wirten gebracht werden (Berrilli et al. 2002). Nach Walton et al. (2004) wiesen hingegen genetische Studien, im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen (Skerratt et al. 2002) an drei hypervariablen Mikrosatelliten-Markern (Walton et al. 1997) darauf hin, dass die *Sarcoptes*-Milbe vom Menschen einer anderen Art als die des Hundes zugehörig ist.

In jedem Fall unterscheiden sich die Milben in physiologischer Hinsicht. Die meisten Varietäten, die auf natürlichem Weg einen Wirt infizieren, sind wirtsspezifisch und können auf anderen Wirten keine permanente Infektion etablieren (Übersicht Arlian 1996). In immunologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *S. scabiei*-Varietäten *suis*, *canis* und *hominis* ihren Wirten einige gleiche Antigene präsentieren, allerdings die Wirte auch Antikörper gegen Varietät-spezifische Epitope der gleichen oder unterschiedlichen Antigene bilden (Arlian et al. 1996a).

Einige bedeutende *Sarcoptes*-Varietäten und ihre Wirte sowie die hier ausgelöste Krankheit sind in Tab. 1 aufgeführt.

**Tab. 1: Darstellung einiger bedeutender *Sarcoptes*-Varietäten, ihrer Wirte und die hier ausgelöste Krankheit.**

<b><i>Sarcoptes</i>-Varietät</b>	<b>Wirt</b>	<b>Krankheit</b>
<i>S. scabiei</i> var. <i>bovis</i>	Rind	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>canis</i>	Hund	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>cuniculi</i>	Kaninchen	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>caprae</i>	Ziege	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>equi</i>	Pferd	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>hominis</i>	Mensch	Skabies
<i>S. scabiei</i> var. <i>ovis</i>	Schaf	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>suis</i>	Schwein	Räude
<i>S. scabiei</i> var. <i>vulpes</i>	Fuchs	Räude

#### 1.1.4 Vorkommen

Die *Sarcoptes*-Milben sind weltweit verbreitet, und trotz verfügbarer Therapeutika rechnet man mit über 300 Millionen infizierten Menschen (Harumural et al. 2003). Bei den Betroffenen handelt es sich besonders um Personen aus sozial benachteiligten Bevölkerungsschichten (Currie et al. 1994), um immundefiziente Patienten und um Bewohner aus Gemeinschaftseinrichtungen (Buffet und Dupin 2003). Die Hygiene spielt bei der Infektion eine untergeordnete Rolle, vielmehr ist diese durch den engen Kontakt der Menschen bei Überbevölkerung besonders in Armutsgebieten bedingt (McCarthy et al. 2004). Über den Reiseverkehr ist die Einschleppung der Milben jahreszeitlich nicht begrenzt, allerdings ist in Europa nördlich der Alpen die Ausbreitungsgefahr der Skabies im Herbst und Winter größer als zu anderen Jahreszeiten. Insbesondere in der Familie sowie in Gemeinschaftseinrichtungen wie Jugend- und Altenheimen oder Krankenhäusern werden die Milben schnell verbreitet (Robert-Koch-Institut 2000, Wendel und Rompalo 2002).

Die Prävalenzen bei Schweinen wurden in unterschiedlichen Ländern Europas ermittelt. Sie lagen zwischen 36% und 86% (Gutiérrez et al. 1996, Alonso de Vega

1998, Smets und Vercruysse 2000). In den USA fand man Prävalenzen von 56% (Davies et al. 1996). In Botswana waren 40% aller getesteten Schweine *Sarcoptes*-positiv, aber die Krankheit trat bei Schweinen, die jünger als 12 Monate waren häufiger (70%) als bei den älteren (33.33%) auf (Nsoso et al. 2000). In Tanzania konnte die Räude dahingegen in 91% der untersuchten Betriebe nachgewiesen werden (Kambarage et al. 1990). In einer anderen Studie in Ghana wurden die Milben auf 38% der untersuchten Schweine gefunden (Permin et al. 1999).

### 1.1.5 Pathogenese und Klinik

Die *Sarcoptes*-Milben sind die Erreger der sogenannten Räude beim Tier und der Skabies beim Menschen. Bei Patienten mit einer Erstinfektion treten die Symptome erst nach sechs bis acht Wochen der Infektion in Erscheinung. Die Krankheit ist durch starken Pruritus gekennzeichnet. Typischerweise treten zwei Formen des Hautausschlages auf: Die eine Form äußert sich in erythematösen papulären oder vesikulären Läsionen, die mit den Milbengängen assoziiert sind. Bei der zweiten Form handelt es sich um einen eher generalisierten papulären, juckenden Hautausschlag, der unabhängig von der Milbenaktivität auftritt (McCarthy et al. 2004). Der Juckreiz verstärkt sich besonders in den Abendstunden, wenn sich der Wirt in sein Schlaflager begibt (McCarthy et al. 2004). Grund dafür ist die verstärkte Grabtätigkeit der Milben bedingt durch die Bettwärme (Übersicht Roos et al. 2001). Eine unbehandelte Skabies ist oft mit einer Pyodermie, in erster Linie durch eine Sekundärinfektion mit *Staphylococcus pyogenes* bedingt, assoziiert (Currie und Carapetis 2000).

Bei immunkompetenten Personen treten meist nur äußerst geringe Milbenanzahlen zwischen zehn und 20 auf (Buffet und Dupin 2003), die die typische Symptomatik hervorrufen können. Eine Sonderform der Skabies stellt die Skabies norwegica (krustöse Skabies) dar, die bevorzugt bei Patienten mit erworbener Immundefizienz oder bei denen andere immunsuppressive Bedingungen herrschen, auftritt. Sie ist aber auch bei Personen, bei denen keine Immundefizienz bekannt ist, zu beobachten (Arlian et al. 2004). Diese Form der Skabies ist durch einen Massenbefall mit bis zu 4000 Milben pro Gramm Haut (Harumal et al. 2003) und fehlenden Juckreiz gekennzeichnet. Die genauen Gründe für das Auftreten der krustösen Skabies sind

nicht bekannt (Arlian et al. 2004). Die Räude beim Tier geht ohne therapeutische Behandlung in die krustöse Form über (Harumal et al. 2003).

Beim Menschen ist außerdem das Krankheitsbild der sog. Pseudoskabies bekannt. Diese Art der Infektion ist zu beobachten, wenn der Mensch mit *Sarcoptes*-Varietäten eines anderen Wirtes in Kontakt kommt. In den meisten Fällen treten die typischen Symptome der Skabies auf, allerdings ist die Skabies hier selbst limitierend (Übersicht Burgess 1994).

## 1.2 Bedeutung der *Sarcoptes*-Infektion

Der starke Juckreiz kann zu Schlaflosigkeit und der Bildung von Eitergrind führen, was wiederum ein enormes Unwohlsein des Patienten zu Folge hat. Psychologische Auswirkungen können auftreten, da der Patient engere Kontaktpersonen informieren muss, und dies zu Unannehmlichkeiten führen kann. Die Idee, dass es sich bei der Skabies um eine Krankheit der unteren sozialen Schichten handelt, ist weit verbreitet (Buffet und Dupin 2003).

Aus der Tierproduktion wird von großen ökonomischen Verlusten, bedingt durch Räude-Infektionen, berichtet. Bei chronischen Infektionen können die jährlichen Leistungsverluste für eine Sau zwischen 84 und 115 US Dollar liegen. Die Ursachen liegen hier in der Produktion kleinerer Würfe oder leichter Ferkel. Des Weiteren benötigt ein *Sarcoptes*-infiziertes Schwein eine längere Zeit, bis es das Schlachtgewicht erreicht hat (Arends et al. 1990). Bei mit *Sarcoptes* und *Chorioptes* infizierten Bullen wurden nicht nur eine Verringerung des Gewichts und eine Herabsetzung der Futterverwertungseffizienz beobachtet, sondern auch der Wert des Tierkadavers, welcher die Haupteinnahmequelle des Eigentümers ist, war vermindert. Die Qualität des Leders war ebenfalls stark beeinträchtigt (Rehbein et al. 2003).

## 1.3 Therapie

Die Skabies-Behandlung beruht im Wesentlichen auf der Anwendung verschiedener topischer Substanzen. Im Falle einer *Sarcoptes*-Infektion sollten alle Beteiligten, die in näherem Kontakt zu dem jeweiligen Patienten stehen, behandelt werden, und

auch Kleidung und Wäsche müssen gewaschen werden (Wendel und Rompalo 2002). Im Folgenden sind nur die wichtigsten Therapeutika der Skabies aufgeführt.

Sowohl Lindan als auch Permethrin sind die weltweit am meisten verwendeten Therapeutika gegen die *Sarcoptes*-Infektion (Elgart 1996).

Lindan, eine Organochlorverbindung, wurde jahrelang erfolgreich für die Bekämpfung der Skabies verwendet. Bei seiner Einführung bestand, selbst bei einer Applikation von nur sechs Stunden Dauer, eine 98%ige Heilungsrate (McCarthy et al. 2004). Allerdings gibt es in letzter Zeit Hinweise auf die Entwicklung von Resistenzen der Milben gegen Lindan (Boix et al. 1997). Des Weiteren kann es bei einer topischen Anwendung besonders auf beschädigter Haut systemisch absorbiert werden. Von einer Neurotoxizität bei Säuglingen, Kindern und den Patienten, bei denen Lindan großflächig angewendet wurde, wurde berichtet (Übersicht Roos et al. 2001). Wegen der Toxizität wurde Lindan in vielen Ländern vom Markt genommen. Auch in der Veterinärmedizin ist die Anwendung verboten, da die giftigen Komponenten hier in das umgebene Ökosystem gelangen können (Übersicht Roos et al. 2001).

Permethrin, ein synthetisches Pyrethrin, tötet sowohl die Milben als auch die Eier und scheint besser verträglich als andere Therapeutika zu sein (Elgart 1999). Es besitzt eine geringe Toxizität, und der geringe Prozentsatz, der über die Haut absorbiert wird, wird schnell metabolisiert. Eine einzelne Applikation über Nacht zeigte die gleiche Effektivität wie die Anwendung von Lindan (McCarthy et al. 2004).

Benzylbenzoat, ein Ester von Benzoesäure und Benzyl-Alkohol, welcher toxisch auf das Nervensystem der Milben und gleichzeitig aktiv gegen die Eier wirkt (Buffet und Dupin 2003), zeigte, wie auch Lindan und Ivermectin, *in vitro* eine der höchsten antiskabiotischen Aktivitäten (Walton et al. 2000). Wird es vom Patienten toleriert, besteht eine hervorragende Heilungsrate. Allerdings wirkt Benzylbenzoat stark reizend auf die verletzte Haut und Schleimhäute, was bei der Skabies insbesondere für exkorierte oder ekzematös veränderte Hautzonen beachtet werden muss (Robert-Koch-Institut 2000, Buffet und Dupin 2003, McCarthy et al. 2004). Es kann im Wechsel mit Crotamiton- oder Disulfirammitteln in sonst therapietoleranten Fällen angewandt werden. Die Behandlung muss in der Regel, je nach Symptomatik, ein bis zwei Mal wiederholt werden (Robert-Koch-Institut 2000).

Crotamiton, Crotonamid, wirkt antiparasitisch und gleichzeitig gegen Juckreiz und bakterielle Infektionen. Der Wirkungsmechanismus ist unbekannt. Wegen der

geringen Toxizität wird es für die Behandlung der Skabies bei Kindern empfohlen. Tatsächlich scheint es die geringste Effektivität unter den topischen Behandlungssubstanzen zu zeigen (Buffet und Dupin 2003). Allerdings ergab eine Studie eine hohe Wirksamkeit des Crotamitons nach einer verlängerten Applikation an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Tausch 1999).

Zusammenfassend liegt der Behandlungserfolg für Permethrin zwischen 90% und 100% und für Lindan zwischen 84% und 92%. Eine akarizide Effizienz zwischen 60% und 88% wird mit Crotamiton erzielt, während sie zwischen 76% und 100% für Benzoylbenzoat beträgt (Übersicht Roos et al. 2001).

Ivermectin hingegen ist ein Therapeutikum, das sowohl oral als auch subkutan appliziert wird und günstig und effektiv zur Behandlung der Skabies verwendet werden kann (Brooks und Grace 2002). Es handelt sich hierbei um ein makrozyklisches Lakton, das als Breitbandtherapeutikum gegen Nematoden und Arthropoden eingesetzt wird (McCarthy et al. 2004). Ivermectin inhibiert die durch die Gamma-Aminobuttersäure induzierte Neurotransmission (Chosidow 2000). Beim Menschen wird es u.a. zur Behandlung diverser Filarieninfektionen eingesetzt. Eine zweifache orale Applikation bei Skabies-Patienten im Abstand von zwei Wochen hat eine 100%ige Wirkung gezeigt (Elmogy et al. 1999). Eine einfache Injektion des Akarizids führte bei Schweinen zu einer Verminderung, aber keiner vollständigen Beseitigung der Erkrankung (Wallgren und Bornstein 1997). Aktuelle Studien an Bullen zeigten eine gute Effizienz der Milbeneliminierung durch die Injektion von Ivermectin (Rehbein et al. 2003). Eine einmalige adäquate Applikation von Ivermectin, ebenfalls ein makrozyklisches Lakton, führte zur Milbenbeseitigung in einer Schweineherde (Jacobson et al. 2000). Bei HIV-Patienten und anderen Patienten, die an der krustösen Form der Skabies litten, wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Behandlung mit atopischen Therapeutika notwendig ist (Meinking et al. 1995, Meinking und Elgart 2000). Aktuelle Studien (Currie et al. 2004) ergaben, dass auch gegen das Ivermectin Resistenzen entwickelt worden sind. In Deutschland sind Mittel zur oralen Behandlung der Skabies beim Menschen, wie auch Thiabendazol, nicht zugelassen (Robert-Koch-Institut 2000).

## 1.4 Immunologie

### 1.4.1 Immunreaktive *Sarcoptes*-Antigene

Als antigenwirksame Komponenten werden Eier und Kot sowie Speicheldrüsensekret und Sekrete aus den Geschlechtsorganen beschrieben (Matthes et al. 1992, Arlian et al. 1994b). Ein Großteil der Antigene gelangt nach dem Absterben der Milben, während der nachfolgenden Zersetzung der Individuen, in den Wirt (Arlian et al. 2000). In Studien an Hunden wurden diverse native *Sarcoptes*-spezifische Antigene ermittelt, die potenzielle Diagnostik-Kandidaten sein könnten (Arlian et al. 2000). Mittels der Kreuzimmunelektrophorese (CIE) wurden 12 verschiedene Antigene gefunden, die mit dem Serum *S. scabiei* var. *canis*-infizierter Kaninchen reagierten. Im Western Blot fand man im Serum von mit *S. scabiei* var. *canis*-immunisierten oder -infizierten Kaninchen spezifische Antikörper gegen mehr als 25 Proteine (Übersicht Arlian 1996).

### 1.4.2 Immunantwort bei einer *Sarcoptes*-Infektion

Die *Sarcoptes* Milben leben im *Stratum corneum* der Haut und ernähren sich nicht von Blut, wie die meisten anderen Ektoparasiten, sondern von Gewebeflüssigkeiten und Zellbestandteilen. Obwohl es sich bei dem *Stratum corneum* um totes Gewebe handelt, gelangen die Antigene in die tieferen epidermalen und dermalen Hautschichten und induzieren eine humorale, inflammatorische und eine zellvermittelte Immunantwort (Arlian et al. 1994a + b, Arlian et al. 1995). Primäre Infektionen rufen eine Immunität gegen Reinfektionen hervor (Mellanby 1944, Arlian et al. 1994a + b, Arlian et al. 1996b).

Studien zu immunologischen Aspekten einer *Sarcoptes*-Infektion wurden in der Mehrheit im Hunde- bzw. Kaninchenmodell durchgeführt.

Die Immunantwort des Wirtes auf die Antigene der *Sarcoptes*-Milben wird als Entwicklung über verschiedene Phasen beschrieben, die allerdings nicht von jedem Patienten durchlaufen werden (Davis und Moon 1990, Übersicht Arlian 1996). Dabei handelt es sich um die Phasen der **(1)** Induktion, **(2)** der verzögerten Hypersensitivität (Typ IV), der **(3)** direkten (Typ I) und verzögerten (Typ IV) Hypersensitivität, der **(4)** direkten (Typ I) Hypersensitivität sowie der **(5)**

Desensibilisierung. Zusätzlich wird von Arlian (1996) für die Phase **(3)** eine „späte“ Hypersensitivitätsreaktion beschrieben.

Die Reaktion vom direkten Typ resultiert aus einer Interaktion des Antigens mit IgE-Antikörpern, während dieses bei der Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) nicht der Fall ist. Das *Sarcoptes*-Antigen induziert nicht bei allen Skabies-Patienten die IgE-Produktion und IgE-vermittelten Reaktionen (Morgan et al. 1997, Übersicht Arlian 2002, Arlian et al. 2004). Auf Grund dessen sollten nicht atopische Patienten lediglich verzögerte Hypersensitivitätsreaktionen zeigen (Übersicht Arlian 1996).

In der Phase der Induktion treten bei den meisten Patienten, abhängig von der Stärke der Infektion, vier bis acht Wochen lang keine klinischen Symptome auf. Hier könnte das Zytokin IL-6, das in der anfänglichen Phase vermehrt produziert wird, einen herabregulierenden Effekt haben, indem es die Effekte des hochregulierten IL-1 und herunterregulierten IL-1ra (s.u.) überdeckt (Arlian et al. 2003).

In sensibilisierten Wirten erscheinen in der Phase der verzögerten (Typ IV) Hypersensitivität nach 24 bis 28 h klinische Symptome wie Rötungen, Schwellungen und Juckreiz. Hier erfolgt die Antigenpräsentation in den lokalen Lymphknoten. T-Zellaktivierung, Migration der antigenspezifischen T-Zellen zu den Hautläsionen, Interaktionen mit Zytokinen und anderen Zellen finden hier statt, und es erfolgt die Infiltration mit inflammatorischen Zellen. Die zellulären Infiltrate enthalten im Allgemeinen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen, andere Lymphozyten und inflammatorische Zellen. Die Ablagerung der Immunglobuline und des Komplements erfolgen in dieser Phase (Übersicht Arlian 1996).

Eine wiederholte Antigenpräsentation (Challenge) kann in der Phase der direkten (Typ I) und verzögerten (Typ IV) Hypersensitivität resultieren. Innerhalb von 10 bis 20 min kommt es zu Rötungen und Schwellungen. Die direkte Reaktion ist eine lokale allergische Reaktion, die durch die Bindung des Antigens an die IgE-Antikörper bedingt ist. Diese IgE-Antikörper sind bereits an die in der Dermis vorhandenen Mastzellen gebunden. Die Phase der direkten Hypersensitivität geht bei sensibilisierten, allergischen Patienten gewöhnlich in die der verzögerten Hypersensitivität (Typ IV) über. Die von Arlian (1996) beschriebene späte Reaktion ist durch gemischte Zellinfiltrationen von Eosinophilen, Neutrophilen und CD4<sup>+</sup>, nicht aber durch das Vorhandensein von Immunglobulinen und Komplement



gekennzeichnet. Die direkte Hypersensitivität (Typ I) kann auch ohne verspätete Reaktionen erfolgen (Übersicht Arlian 1996).

Theoretisch kann eine chronische *Sarcoptes*-Infektion in einer Desensibilisierung resultieren. Eine Immunität entsteht, und es kommt durch die Blockierung oder Herabregulierung der T-Zellrezeptoren zu keiner Hypersensitivitätsreaktion. Dieses kann in Patienten mit krustöser Skabies auftreten und könnte erklären, aus welchem Grund diese Patienten geringen Juckreiz empfinden, so dass sich die Milbenpopulation extrem ausbreiten kann (Übersicht Arlian 1996).

Die Immunantwort in Hunden, Schweinen und Menschen ist durch gemischte Zellinfiltrationen in den Hautläsionen sowie der Produktion von Antikörpern charakterisiert (Stemmer et al. 1996). Die Zellinfiltrate setzen sich im Wesentlichen aus Neutrophilen, Makrophagen, Plasmazellen und anderen mononukleären Zellen zusammen (Morsy und Gaafar 1989, Arlian et al. 1994a, Arlian et al. 1995).

Untersuchungen an Hautäquivalenten vom Menschen (human skin equivalents, HSE) zeigten, dass die *Sarcoptes*-Milben die Sekretion der Keratinozyten von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren (Arlian et al. 1995), womit diese Zellen eine Schlüsselrolle bei der Initiation der inflammatorischen und Immunreaktion auf die Skabies einnehmen könnten. Zu dem gleichen Schluss führten Studien von Arlian et al. (2003), die eine Herabregulierung des IL-1ra, dem kompetitiven Inhibitor von IL-1, durch die Keratinozyten, zeigten. Sowohl die Anhäufung der Langerhanszellen in den skabiösen Läsionen, als auch die Tatsache, dass resistente Wirte eine stärkere Th-1 Antwort als susceptible zeigten, könnte in der Produktion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  begründet sein. Die Anhäufung von Neutrophilen und Lymphozyten könnte ebenfalls durch die Freisetzung des IL-1 bedingt sein (Arlian et al. 1995). Spätere Untersuchungen (Arlian et al. 2003) ergaben allerdings keine Induktion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , was die Autoren in der Versuchsdurchführung begründeten. Sowohl die Produktion von IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma), einem Makrophagen-stimulierenden Molekül, als auch die von IL-4, einem B-Zell-aktivierenden Zytokin, sind bei mit *Sarcoptes*-Milben infizierten Mäusen verstärkt (Lalli et al. 2004).

Die Titer der IgM- und IgG-Antikörper sind in Skabies-Patienten erhöht, während der der IgAs erniedrigt ist, und eine IgE-Antwort nicht bei allen Patienten zu beobachten ist (s.o.). C3-Ablagerungen und das Vorhandensein von Antikörpern im Gewebe nahe der Skabies-Läsionen indizieren die Funktion des Komplementsystems

während einer *Sarcoptes*-Infektion, und dass hier der alternative Weg eingeschlagen wird (Übersicht Arlian 1996).

Eine Primärinfektion mit *S. scabiei* hat eine protektive Immunität zu Folge. Die *Sarcoptes*-Milben induzieren zwar eine starke Antikörperantwort, allerdings ist diese nicht von protektivem Wert (Arlian et al. 1994b). Studien an Kaninchen, die mit Antigen von *Dermatophagoides farinae* und *D. pteronyssinus* immunisiert wurden, zeigten, dass in den Mechanismus der Resistenzentwicklung eine Herunterregulierung der Antwort von T-Helferzellen des Typs 2 (Th2) und damit eine reduzierte Antikörperproduktion involviert ist. Gleichzeitig war eine Heraufregulierung der inflammatorisch-zellvermittelten Antwort von Th1-Zellen zu beobachten (Arlian et al. 1995). Andere Untersuchungen an Kaninchen ergaben, dass sich die Zellinfiltrationen in der Milbenumgebung bei resistenten Kaninchen insofern von denen bei suszeptiblen Wirte unterschied, als dass die Infiltration von Neutrophilen, d.h. phagozytischen Zellen, bei einer Reinfektion schneller und höher war (Arlian et al. 1994a). Ähnliches zeigte sich in Untersuchungen an Hunden, bei denen nach einer Reinfektion die Infiltration der mononukleären Zellen, Neutrophilen und Plasmazellen wesentlich schneller und stärker, und die der Mastzellen nur schneller war (Stemmer et al. 1996). Lebendige *Sarcoptes*-Milben hingegen inhibieren nach einer Immunisierung die Produktion von IFN $\gamma$  in den Lymphknoten von immunisierten Mäusen (Lalli et al. 2004).

Die protektive Immunität bei immunkompetenten Wirten, die sich in der Reduktion der Milbenbürde äußert, ist also mit einer Zell- und nicht mit einer Antikörpervermittelten Antwort assoziiert (Arlian et al. 1994a + b, Übersicht Arlian 1996).

### 1.4.3 Kreuzreaktionen zwischen *S. scabiei* und anderen Milben

Verschiedene Untersuchungen zeigten immunologische Kreuzreaktionen zwischen den *Sarcoptes*- und anderen Milben. In Seren von *Psoroptes ovis*-infizierten Schafen wurden anhand von Immuno-Dot Blots Kreuzreaktionen mit dem Antigen von *S. scabiei* var. *suis*, *Notoedres cati* und *Chorioptes bovis* detektiert (Matthes et al. 1996). Seren von mit *Sarcoptes* infizierten Kaninchen erkannten wenigstens sechs Antigene aus dem Gesamtantigen von *D. farinae*. Umgekehrt reagierten auch die Seren von Kaninchen, die mit Antigen von *D. farinae* immunisiert wurden, mit dem

Antigen von *S. scabiei* (Arlian et al. 1988). Mittels der Kreuzimmunelektrophorese (CIE) wurden in Seren von *Sarcoptes*-infizierten Hunden Antikörper gegen diverse Antigene von Hausstaubmilben gefunden (Arlian et al. 1991). Arlian et al. (1995) immunisierten Hunde mit Milbenextrakten von *D. pteronyssinus* und *-farinae* und stellten eine protektive Immunität bei den Hunden fest. Morgan et al. (1997) fanden bei Skabies-Patienten neben spezifischen auch kreuzreagierende Antikörper gegen *Dermatophagoides*-Milben. Die Prävalenz der Sensitivität gegen Hausstaubmilben ist hoch, und diese sind weit verbreitet (Arlian et al. 1992). Auf Grund dessen gestalten sich das Verständnis der Immunantwort auf die *Sarcoptes*-Infektion sowie die Etablierung einer Serodiagnostik schwierig (Übersicht Arlian 1996, Arlian et al. 2000).

## 1.5 Diagnostik von *Sarcoptes*-Infektionen

### 1.5.1 Konventionelle Diagnostik

Eine *Sarcoptes*-Infektion ist im Allgemeinen bei immunkompetenten Patienten durch das Auftreten geringer Milbenanzahlen und die unterschiedlichen dermalen Manifestationen gekennzeichnet. Daher ist es oft schwierig, einen direkten Milbennachweis zu erbringen (Arlian et al. 2004). Bei der Entnahme von Hautgeschabseln wird die Epidermis mittels eines Skalpells oder eines scharfen Löffels bis zum Austritt von Kapillarblut abgetragen. Diese Hautgeschabsel werden dann mikroskopisch auf Milben oder Eier untersucht. Studien am Schwein zeigten eine höhere Sensitivität dieser Methode, wenn die Hautgeschabsel vor der mikroskopischen Untersuchung in 10% Kaliumhydroxid verdaut und anschließend einer Sucroseflotation unterzogen wurden (Gutiérrez et al. 1996, Alonso de Vega et al. 1998). Nach Smets und Vercruysse (2000) detektiert diese Methode auch tote Milben, so dass Schwierigkeiten bei der Diagnose einer aktuellen Infektion auftreten können. Der direkte Nachweis ist die einzige diagnostische Methode mit einer 100%igen Spezifität, allerdings ist hier die Sensitivität gering (Kessler et al. 2003). Der sog. „Dermatitis Score“ beschreibt das Auftreten einer erythematösen papulären Dermatitis und erwies sich in Studien an Schweinen als adäquate Diagnosemethode der Räude. Die Ermittlung des Kratzindex hingegen, bei dem die Frequenz des

Scheuerns des Wirtes ermittelt wird, erwies sich als unbrauchbar (Smets und Vercruysse 2000).

Eine andere herkömmliche Methode der *Sarcoptes*-Diagnose ist der Nachweis der von den Milben angelegten Bohrgänge beim Menschen. Diese können durch das Auftragen von Tinte auf die Haut und anschließendes oberflächliches Entfernen mit Alkohol sichtbar gemacht werden. Ausgehend von einer Papel, die durch das Durchstoßen der Haut von Nymphenstadien entsteht, werden dann die gefärbten Milbengänge sichtbar (Übersicht Burgess 1994).

### 1.5.2 Nachweis von *Sarcoptes*-DNA

Bezold et al. (2001) amplifizierten mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) hochkonservierte Regionen einer Mikrosatelliten-DNA von *S. scabiei* aus den Hautschuppen einer Patientin, die atypische Skabies-Symptome aufwies und bei der mikroskopisch keine Milben nachgewiesen werden konnten. Nach einer Behandlung der Patientin war die DNA nicht mehr nachweisbar, was die Autoren zu der Folgerung veranlasste, dass die PCR ein adäquates Mittel zur Detektion bisher unerkannter Skabies-Infektionen eingesetzt werden könnte.

### 1.5.3 Serodiagnostik

Es existieren einige kommerzielle Tests, mit Hilfe derer die Serodiagnostik einer *Sarcoptes*-Infektion beim Schwein und beim Hund möglich ist. Diese Tests basieren ausnahmslos auf dem Gebrauch von Gesamtantigen verschiedener *Sarcoptes*-Varietäten. Der Nachteil dieser Systeme liegt besonders in der Notwendigkeit, die Milben für den Gewinn von Antigen auf geeigneten Wirten zu halten und von diesen zu isolieren.

Untersuchungen mit Schweinen ergaben für einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit Antigen von *S. scabiei* var. *vulpes* eine 98%ige Spezifität (Hollanders et al. 1997). Die Sensitivität lag für Ferkel mit 80% am höchsten. Für die Läufer betrug der Wert 78% während er für Sauen lediglich bei 50% lag. Bornstein und Wallgren (1997) ermittelten, ebenfalls unter Verwendung von Gesamtantigen von *S. scabiei* var. *vulpes* im ELISA mit Schweineseren, eine Sensitivität von 87.5%

und eine Spezifität von 99.5%, wenn die klinische Diagnose als Goldstandard eingesetzt wurde. Wurde das Ergebnis einer Hautgeschabseluntersuchung als Goldstandard verwendet, stieg die Sensitivität auf 100%, die Spezifität sank allerdings auf 32.8%. Auch bei Smets und Vercruysse (2000) trat keine positive Korrelation zwischen serologischen Ergebnissen und denen des direkten Milbennachweises auf. Die Autoren, wie auch Hollanders et al. (1997), wiesen darauf hin, dass der serologische Räude-Nachweis bei Tieren, die jünger als sieben bzw. acht Wochen sind, falsch positive Ergebnisse auf Grund der Persistenz von maternalen Antikörpern ergeben kann. Falsch positive Ergebnisse können ebenfalls in der Detektion von Antikörpern, die auch neun bis zwölf Monate nach einer Behandlung chronisch infizierter Tiere vorhanden sein können, begründet sein (Smets und Vercruysse 2000). Ein Vergleich verschiedener kommerziell erhältlicher ELISAs (Kessler et al. 2003) zur Detektion von Antikörpern gegen *Sarcoptes*-Milben beim Schwein und andere Untersuchungen (van der Heijden et al. 2000, Löwenstein et al. 2004) zeigten, dass die Detektion von Antikörpern abhängig von der Wahl des jeweiligen Tests ist. Curtis (2001) kam zu dem Schluss, dass serologische Untersuchungen die herkömmlichen Untersuchungsmethoden wie die Entnahme von Hautgeschabseln nicht ersetzen können, sondern bei negativen Befunden als Methode hinzugezogen werden sollten. Andere serologische Studien an Hunden erwiesen den ELISA als nützliches Diagnosemittel (Lower et al. 2001), das spezifischer als die Aufnahme von Hautläsionen oder des Kratzindizes ist (Jacobson et al. 1999).

## **1.6 Serodiagnostik von Parasiten unter Verwendung rekombinanter Antigene**

Es wurden diverse Parasitenantigene rekombinant exprimiert, mit Hilfe derer eine Serodiagnose der jeweiligen Parasitose optimiert wurde. Verschiedene Autoren haben rekombinante Antigene mit hoher Sensitivität und Spezifität im ELISA getestet, um Infektionen durch verschiedene Protozoen zu detektieren (Katende et al. 1998, Kimbita et al. 2001, Salotra et al. 2002, Meira et al. 2002, Chahan et al. 2003, Kim et al. 2004). Auch Helmintheninfektionen, sowohl von Parasiten der inneren Organe (Schnieder 1992, Ramachandran et al. 1997, Cornelissen et al. 2001, Virginio et al.

2003, Nagano et al. 2004) als auch von Filarien (Bradley et al. 1991, Lucius et al. 1992, Nde et al. 2002, Klion et al. 2003) wurden mit Hilfe von rekombinanten Antigenen spezifisch detektiert.

Bei *Psoroptes ovis* ist ein Homolog einer Cystein-Protease rekombinant exprimiert worden, das immundominant ist (Lee et al. 2002), allerdings sind keine Studien hinsichtlich einer Serodiagnostik unternommen worden. Weitere Berichte über die Serodiagnose von Ektoparasiten anhand rekombinanter Antigene liegen nicht vor.

Dahingegen sind von diversen freilebenden Milben rekombinante Antigene, wie das *Blo t 5* von *Blomia tropicalis* oder das *Der p 5* von *D. pteronyssinus*, exprimiert und in Pilotstudien erfolgreich zur Serodiagnose von Allergien eingesetzt worden (Übersicht Chapman et al. 2000).

## 1.7 Molekularbiologische Studien mit *S. scabiei*

Bis zu dem heutigen Zeitpunkt ist kein System entwickelt worden, mittels dessen die *Sarcoptes*-Milben *in vitro* gehalten werden können, so dass die Parasiten von dem betreffenden Wirt isoliert werden müssen. Wegen der geringen Größe und der im Allgemeinen geringen Anzahlen der Milben ist es schwierig, geeignete Mengen Parasitenmaterial zu erhalten (Fischer et al. 2003). Molekulare Interaktionen zwischen dem Parasiten und seinem Wirt sind aus diesem Grund bis in die jüngste Vergangenheit weitestgehend unbekannt geblieben (Ljunggren et al. 2003, Harumal et al. 2003). Zum heutigen Zeitpunkt wird in der Literatur über die Existenz zweier cDNA-Bibliotheken von *S. scabiei* berichtet (Mattson et al. 2000, Fischer et al. 2003), und es wurde eine Datenbank von mehr als 1000 expressed sequence tag (EST)-Sequenzen erstellt. Mittels dieser Informationen können Gene, die als Kandidaten für weitere Studien gelten, ermittelt werden (Ljunggren et al. 2003). Auf Grund der besseren Verfügbarkeit von Hausstaubmilben sind auf diesem Gebiet die Erkenntnisse aus molekularbiologischer Sicht weitaus fortgeschrittener als auf dem Gebiet der *Sarcoptes*-Milben. Auf der Basis dieser Ergebnisse haben verschiedene Arbeitsgruppen *Sarcoptes*-Homologe zu Hausstaubmilbenallergenen identifiziert, und diese teilweise kloniert und exprimiert (Fischer et al. 2003, Holt et al. 2003, Holt et al. 2004).

Auch immunreaktive Antigene und Fragmente sind isoliert, kloniert und exprimiert worden (Mattsson et al. 2000, Harumal et al. 2003). Diese zeigten aber bisher auf Grund von Kreuzreaktionen keinen Wert für die Serodiagnostik (Harumal et al. 2003).

## 1.8 Ziel dieser Arbeit

Ein diagnostisches Mittel, bei dem rekombinantes Antigen anstelle des Gesamtantigens von *Sarcoptes*-Milben verwendet wird, könnte die kommerziell erhältlichen ELISAs kostengünstig ersetzen. Der Einsatz hochspezifischer Antigene bedeutete außerdem die Reduktion falsch positiver Diagnosen, die z. Z. auf Grund von Kreuzreaktionen mit Hausstaubmilbenantigen ein Problem in der Serodiagnostik von *Sarcoptes*-Infektionen darstellen.

In dieser Arbeit sollten immunreaktive Antigene von *S. scabiei* identifiziert und auf ihr diagnostisches Potenzial in der Serodiagnostik der Skabies beim Menschen untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein geeignetes Expressionssystem für die rekombinanten Antigene ermittelt werden, in dem diese von Patientenseren erkannt werden. Anschließend sollte eine Expressions-Genbank von *S. scabiei* var. *suis* angelegt werden. Es war die Isolierung von 60 immunreaktiven Klonen vorgesehen, die mittels immunologischer Durchmusterung der Genbank unter Verwendung von Patientenseren identifiziert werden sollten. In vergleichenden Untersuchungen sollten diese Antigene auf ihre Spezifität und Sensitivität getestet werden. *Sarcoptes*-spezifische Antigene sollten in geeignete Expressionssysteme kloniert, heterolog exprimiert und die Proteine aufgereinigt werden, um in vergleichenden Studien im ELISA auf ihre Sensitivität getestet werden zu können. Es sollten die Voraussetzungen für die Entwicklung eines ELISAs mit hoher Spezifität und Sensitivität geschaffen werden, der herkömmliche Methoden zur Diagnostik von Skabies-Infektionen beim Menschen ersetzt. Zusätzliche Studien mit Seren von Schweinen sollten zeigen, ob die identifizierten Antigene auch für die Diagnose der Räude beim Schwein verwendet werden können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Parasiten- und Tiermaterial

*Sarcoptes scabiei* var. *suis*

Dr. H.-F. Matthes, Afosa GmbH,  
Luckenwalde

*Sarcoptes scabiei* var. *bovis*

Dr. S. Rehbein, Merial GmbH, Rohrdorf

*Sarcoptes scabiei* var. *vulpes*

Dr. H.-F. Matthes, Afosa GmbH,  
Luckenwalde

*Dermatophagoides pteronyssinus*

Dr. H.-F. Matthes, Afosa GmbH,  
Luckenwalde

BALB/c-Mäuse

hausteigene Zucht

#### 2.1.2 Laborgeräte

Bioanalyzer

Agilent Technologies, Palo Alto, USA

Biophotometer

Eppendorf, Hamburg

Elektrophorese Apparaturen

Pharmacia Biotech, Freiburg  
AGS, Heidelberg

Cryocut E Reichert-Jung

Leica, Solms

Elektronische Präzisionswaage BP 3100 S

Sartorius, Göttingen

ELISA-Reader MRX

Dynatech MRW Laboratories, Denkendorf

ELISA-Waschgerät

Dynatech MRW Laboratories, Denkendorf

Inkubatoren

Wärmeschrank

Memmert, Schwabach

Schüttelinkubator

New Brunswick Scientific, Niederlande

Hybridisierungssofen

Biometra, Göttingen

Magnetrührer

IKA Labortechnik, Staufen

Mikroskope

Leica DM/R

Leica, Solms

Zeiss Axioplan

Zeiss, Oberkochen

Leica TCS NT

Leica, Solms

EM 900 Elektronenmikroskop

Zeiss, Oberkochen

pH-Meter

WTW, Weilheim

Präzisionspipetten

Eppendorf, Hamburg

Sterilwerkbank

Heraeus Christ, Zürich

Thermoblock

MJ Research PTC-200

BIOzym, Hessisch Oldendorf

Ultracut S

Leica, Wien

Ultraschall-Desintegrator, Sonifier W-250	HTU, Schwäbisch Gmünd
UV Stratalinker® 1800	Stratagene, Heidelberg
Video-Dokumentationsgerät E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Wasserbad DC3	Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge 4804 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Großraumkühlzentrifuge J2-HS	Beckmann, München

### 2.1.3 Einwegartikel

Biodyne A Transfer Membranen	Pall, Portsmouth, England
Einbettungsschalen	
Tissue Tek® Cryomold® Biopsy	Miles Inc., Elkhart, USA
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einweg-Pipetten (10 und 25 ml)	Costar, Bodenheim
Gefrier Röhrchen	Greiner, Nürtingen
Kodak BIOMAX Light-1 Röntgenfilm	Sigma, Steinheim
Mikrotiterplatten (Flachboden)	Corning Life Science, Schiphol, Niederlande
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose Rundfilter Protran BA 83	Schleicher & Schuell, Dassel
Nunc Immuno™-Plates, 96 wells	Nunc, Wiesbaden
Objektträger SuperFrost®*/Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen, ø 14 cm und 145 cm	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht Greiner Nürtingen
Pipettenspitzen, RNase frei	Roth, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Nürtingen
Reaktionsgefäße	Greiner Nürtingen Eppendorf, Hamburg
S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Nürtingen
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin
Zellschaber	Biochrom, Berlin

### 2.1.4 Mehrwegartikel

Dialyseklemmen	Roth, Karlsruhe
Mikroliterspritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Micropistill	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.5 Reagenzien

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Serva, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Steinheim
Bleinitrat	Merck, Darmstadt
Antibiotika	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Dinatriumsalz (BCIP)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)	AppliChem, Darmstadt
Chlornaphtol	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
CSPD	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid (DMF)	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (Ellmann's Reagenz)	AppliChem, Darmstadt
dNTPs	Rapidozym, Berlin
Entwicklungslösung (Kodak Readymatic)	Siemens, Erlangen
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethylendinitrotetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol reinst	AppliChem, Darmstadt
Ethanol vergällt	HU-Berlin
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt

---

Fetales Kälberserum (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fixierlösung (Kodak)	Siemens, Erlangen
Gelatine	Serva, Heidelberg
Glucose	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
red. Glutathion	Sigma, Steinheim
Glutaraldehyd	Sigma, Steinheim
Glutathione Sepharose® 4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidinium	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Maltose	AppliChem, Darmstadt
MEM-EARLE Medium	Biochrom, Berlin
Methanol, reinst	AppliChem, Darmstadt
2 C 180 Methylenblau Unna	ChromaGesellschaft, Münster
Monohydrat-Citronensäure	Roth, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt
Mowiol® 40-88	Sigma, Steinheim
Na-Acetat	AppliChem, Darmstadt
Na-Borhydrid	Roth, Karlsruhe
Dimethylarsensäure Natriumsalz-Trihydrat (Na-Cacodylat)	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Hereaus, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Na-Metaperjodad	AppliChem, Darmstadt
p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
p-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamin	Sigma, Steinheim
Ni-NTA-Matrix	QIAGEN, Hilden

Osmiumsäure (OsO <sub>4</sub> )	Plano, Wetzlar
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
PhastGel®BlueR	Amersham, Freiburg
Phenol	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Steinheim
Phosphatase Substrat Tabletten	Sigma, Steinheim
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth, Karlsruhe
RNAse Block	Stratagene, Heidelberg
RPMI-Medium	Biochrom, Berlin
D(+)-Saccharose	AppliChem, Darmstadt
Sodiumdodecyl (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Squalan	Roth, Karlsruhe
Synperonic® L101	Serva Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek®	Sakura, Zoeterwoude
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Tabletten	Sigma, Steinheim
Tris Base	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20 bzw. 100	AppliChem, Darmstadt
Tyrodepuffer	Sigma, Steinheim
Uranyl Acetat	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe

### 2.1.6 Kommerzielle Kits und Standards

BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
BD Advantage™ 2 PCR Kit	BD Biosciences, Heidelberg
BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD Biosciences, Heidelberg
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche, Mannheim
Geltrockner-Kit	Promega, Heidelberg
Imject® Maleimide Activated mCKLH Kit	Pierce, USA
NucleoSpin® Mini Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren

---

NucleoBond® Midi Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® Extraction Kit	Macherey & Nagel, Düren
NucleoTrap® Gel Extraction Kit	Macherey & Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder spin columns	QIAGEN, Hilden
Sarcoptes-ELISA 2001®	Afosa GmbH, Luckenwalde
prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Schwalbach
1 kb DNA Ladder	Rapidozym, Berlin

### 2.1.7 Enzyme

DNA-Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase H(-) Point Mutant	Promega, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Steinheim
Taq-Polymerase	Rapidozym, Berlin
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

### 2.1.8 Seren und Antikörper

Die Skabies-positiven Humansenen sowie die der Hausstaubmilbenallergiker waren vor der Verwendung in dieser Arbeit im ELISA auf Antikörper gegen *Sarcoptes scabiei* var. *suis* Gesamtantigen von der Afosa GmbH (Luckenwalde) getestet worden. Die Berechnung der Indizes erfolgte auf der Grundlage von mitgeführten Positiv- (OD=1.0) und Negativ-Kontrollseren (OD=0.00). Im Folgenden sind die IgG- und IgM-Titer der verwendeten Skabies-positiven Seren aufgeführt (s. Tab. 2):

Tab. 2: IgG- und IgM-Titer der für das Immunoscreening (A) und den ELISA mit rekombinanten Antigenen (B) genutzten Skabies-positiven Humansenen (ermittelt von der Afosa GmbH, Luckenwalde)

A	Seren			B	Seren					
	Serum	IgG	IgM		Serum	IgG	IgM	Serum	IgG	IgM
	KT 11	1.251	0.525		KT 4	0.599	2.095	L 26	1.288	0.018
	KT 31	0.433	1.201		KT 29	0.267	0.803	L 29	1.0	1.0
	KT 36	0.911	2.095		KT 53	1.246	0.092	L 30	0.336	0
	L 8	0.859	1.209		IF	0.765	0	L 45	0.428	2.489
	L 31	0.430	1.202		SF	1.329	0	L 46	1.419	0.19
	L 45	0.428	2.489		HG	1.251	0.525	LWD	0.827	0.934
	L 47	0.454	1.766		L 1	0.439	0.581	L 59	0.434	0
	L 57	0.354	0.501		L 8	0.859	1.209	L 64	0.264	0.54
	L 67	0.827	0.934		L 12	1.378	0.13	L 68	1.0	1.0
	L 68	1.0	1.0		L 24	0.205	0.119	L 69	0.749	0.478

Die IgG-Titer der Schweineseren, die in dem ELISA mit rekombinantem Antigen verwendet wurden, wurden vor Gebrauch im Sarcoptes-ELISA 2001® (Afosa GmbH) getestet. Die Indizes sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Humansenen  
(Skabies-positive und  
Hausstaubmilbenallergiker)

Humansenen (Skabies negativ)

Schweineseren

Dr. H.-F. Matthes, Afosa GmbH,  
Luckenwalde

Mitarbeiter des Lehrstuhls für Molekulare  
Parasitologie

Dr. H.-F. Matthes, Afosa GmbH,  
Luckenwalde

BALB/c-Seren	
anti-Peptid-A2, -B2 und -D2	
anti-Ss18/GST	
anti-GST	Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie
His-Antibody (100) isotype mouse IgG <sub>1</sub>	QIAGEN, Hilden
anti-GST Antibody	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
anti-24-4	Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie
Ziege-anti-Human IgG (H+L) POX	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L) POX	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L) FITC	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L) AP	Dianova, Hamburg
anti-Digoxigenin-Antikörper	Roche, Mannheim

### 2.1.9 Primer

Die Primer wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) und TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

#### OligodT

rückwärts (OligodT): 5' TTT TTT TTT TTT 3'

#### TPI (Triosephosphatisomerase)

vorwärts (5'): 5' AAA TTT TT(CT) GTG GGI GG(AGCT) AA(CT) TGG AA 3'

rückwärts (3'): 5' CCA ATA GCC CA(AT) ACI GG(CT) TC(AG) TA 3'

#### CCE (Aktin)

vorwärts (104): 5' TGA TCT TGA TCT TCA TGG TGC TGG G 3'

rückwärts (105): 5' AGA TGG TGT CAC CCA CAA TGT 3'

#### Triplex-Insertion

vorwärts (Triplex5'): 5' CTC GGG AAG CGC GCC ATT GTG TTG GT 3'

rückwärts (Triplex3'): 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAA TTG GCC 3'

#### GA-Sonde

vorwärts (RepGA-F): 5' ATT CAT TTC AAT CAG ATG T 3'

rückwärts (RepGA-R): 5' CCT TCT TCT CCT TTT CTT C 3'

#### 5' RACE

rückwärts (GArep5'RACE-R): 5' GTC ATC AGG ATT ATT CGG AGC GGG 3'

rückwärts (RACE5'-Ss18R): 5' AAT CAA ATT CAT TAG CCA GAA TCC CC 3'

#### Ss-4

vorwärts (F2): 5' CGG GAT CCA TGA AAT ACG ATT TCA GTG G 3'

rückwärts (R): 5' AAA CTG CAG TTA TTT GTT ATC GGA CTG TC 3'



**Ss-7**

vorwärts (F2): 5´ CGG GGA TCC CTG AAG ATC AGA AGA AAC CTG 3´  
 rückwärts (R2): 5´ CGG CTG CAG CAG TTT CGA TAT CAG TAA CGA 3´

**Ss-14**

vorwärts (F): 5´ CCG GAA TTC TAC GGC CGT GGG GCT GAT TCT 3´  
 (F3): 5´ CGG GAT CCT ACG GCC GTG GGG CTG ATT CT 3´  
 (F4): 5´ CGG GAT CCA CGG CCG TGG GGC TGA TTC TG 3´  
 rückwärts (R): 5´ GAA TGC GGC CGC GGA ATT TTA CCA GCA TCA 3´  
 (R3): 5´ GCC GCT GCA GGG AAT TTT ACC AGC ATC ACC 3´  
 5´Ende (14-5´): 5´ GCC AGA ATC AGC CCC ACG GCC GTA 3´

**Ss-17**

vorwärts (FoSp): 5´ CGG GAT CCT ATG TCG TCG ATC AGA A 3´  
 rückwärts (R): 5´ AAA CTG CAG TCA TTT TTT AAG TCC AG 3´

**Ss-18**

vorwärts (F): 5´ CCG GAA TTC CTT ACG GCC GGG GAT TCT GG 3´  
 (F3): 5´ CGG GGA TCC CTT ACG GCC GGG GAT TCT GG 3´  
 (F4): 5´ CGG GAT CCT TAC GGC CGG GGA TTC TGG C 3´  
 rückwärts (R): 5´ GAA TGC GGC CGC CTT TGC CTT TTC CTC CTT CTC 3´  
 (R2): 5´ ACG CCT GCA GCT ACT CCT TCG CCT TCA CCT 3´

**Ss-23**

vorwärts (FoSP): 5´ CGG GGA TCC AAA GGT GTT TCG ATA AAT CCT 3´  
 rückwärts (RoSP): 5´ CGG CTG CAG CCG ATT CCT TCT TAT TTT TTC 3´

**Ss-37**

vorwärts (F2): 5´ GGG GTA CCA TAC TTT CTT CAC TTT TG 3´  
 rückwärts (R): 5´ CCC CTG CAG TTA ACT CTC GCC ATT 3´

**Ss-97**

vorwärts (oSP): 5´ CGG GAT CCA AAG AAG ATA AGG AGC TA 3´  
 rückwärts (R): 5´ AAC TGC AGC CTT TCC CTC TAC CTT TG 3´

**Ss-134**

vorwärts (F2): 5´ CGG GGA TCC ATG GGT AGT CAA CAA GGA G 3´  
 rückwärts (R): 5´ CGG CTG CAG CTA TTT GCT TCC AAT AGC TC 3´

## 2.1.10 Synthetische Peptide

Die Peptide wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. R. Volkmer-Engert (Medizinische Immunologie, Charité) synthetisiert.

**A2-C:** N' C-BA-KEEKEKKEKEEKEKKEKE 'C

**B2-C:** N' C-BA-QMYNEGQDPSMPTLTR 'C

**D2-C:** N' C-BA-DSFQSDVDEFQRYS 'C

## 2.1.11 Vektoren, cDNA-Banken und *E. coli*-Stämme

### 2.1.11.1 Expressionsvektoren

pTriplEx2	Clontech BD Biosciences, Heidelberg
pQE-30, -31 und -32	QIAGEN, Hilden
pET-28a-c (+)	Novagen, Bad Soden
pET-41a (+)	Novagen, Bad Soden

### 2.1.11.2 cDNA-Bank

<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>suis</i> cDNA-Bank	Clontech BD Biosciences, Heidelberg
---	-------------------------------------

### 2.1.11.3 *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> BM25.8	Clontech BD Biosciences, Heidelberg
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Promega, Heidelberg
<i>E. coli</i> JM109	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Clontech BD Biosciences, Heidelberg

## 2.1.12 Lösungen und Puffer

### 2.1.12.1 Agarosegel-Elektrophorese Puffer

6 x Agarose-Ladepuffer	40% D(+)-Saccharose 0.005% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Lösung	1% in dest. H <sub>2</sub> O
10 x FA-Gel-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA in RNase-freiem dest. H <sub>2</sub> O pH 7
1 x FA-Gel-Laufpuffer	1 x FA Gel-Puffer 0.74% Formaldehyd in RNase-freiem dest. H <sub>2</sub> O
5 x RNA-Ladepuffer	0.16% ges. Bromphenolblaulösung 4 mM EDTA, pH 8 2.7% Formaldehyd 20% Glycerol 30.1% Formamid 4 x FA Gel Puffer in RNase-freiem dest. H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 0.11% Essigsäure pH 8

### 2.1.12.2 Antibiotika

Ampicillin	100 mg/ml dest. H <sub>2</sub> O in Kultur: 1/1000
Chloramphenicol	34 mg/ml dest. H <sub>2</sub> O in Kultur: 1/1000
Kanamycin	25 mg/ml dest. H <sub>2</sub> O in Kultur: 1.5/1000
Tetrazyklin	20 mg/ml in Ethanol in Kultur: 1.5/1000

**2.1.12.3 Bakterien-Kulturmedien**

IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in dest. H <sub>2</sub> O
LB-Medium	0.5% NaCl 1% Trypton 0.5% Hefextrakt in dest. H <sub>2</sub> O, pH 7.5 autoklavieren für Phagen: 0.2% Maltose 10 mM MgSO <sub>4</sub> sterilfiltriert
LB-Agar	LB-Medium 1.5% Agar autoklavieren für Phagen: 10 mM MgSO <sub>4</sub> sterilfiltriert
SOB-Medium	0.05% NaCl 0.5% Hefeextrakt 2% Trypton 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> autoklavieren
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose, sterilfiltriert
TB-Puffer	10 mM PIPES 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl pH 6.7 55 mM MgCl <sub>2</sub> sterilfiltrieren
Top-Agar	LB-Medium 0.7% Bacto-Agar autoklavieren 10 mM MgSO <sub>4</sub> , sterilfiltriert
X-Gal	2% in DMF

**2.1.12.4 SDS-PAGE**

APS-Stammlösung	10% APS in dest. H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	10% Essigsäure 20% Ethanol vergällt 0.2% PhastGel <sup>®</sup> BlueR
Coomassie-Entfärbelösung	10% Essigsäure 20% Ethanol vergällt
Laufpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 0.1% SDS
Lösung L	1.5 M Tris-HCl 0.4% SDS pH 8.4

Lösung M  
0.5 M Tris-HCl  
0.4% SDS  
pH 6.8

### Acrylamid-Gebrauchslösungen

	6% (Sammelgel)	10% (Trenngel)	12% (Trenngel)
<b>Acrylamid (30%)</b>	0.375 ml	1.65 ml	2 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1.5 ml	2.05 ml	1.75 ml
<b>Lösung L</b>	-	1.25 ml	1.25 ml
<b>Lösung M</b>	0.625 ml	-	-
<b>TEMED</b>	2.5 µl	5 µl	5 µl
<b>APS (10%)</b>	25 µl	50 µl	50 µl

2 x Probenpuffer  
10% Glycerin  
5% β-Mercaptoethanol  
3% SDS  
100 mM Tris-HCl  
0.02% Bromphenolblau

### 2.1.12.5 Immunoscreening, Western Blot

AP-Entwicklungspuffer  
100 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9.5

BCIP-Stammlösung  
5% in DMF (100%)

Chlornaphtol-Lösung  
0.4% in Methanol

10 x λ-Dilution-Buffer  
1 M NaCl  
0.1 M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0.35 M Tris-HCl pH 7.5  
autoklavieren

1 x λ-Dilution-Buffer  
1 x λ Dilution Buffer  
0.01% Gelatine

NBT-Stammlösung  
5% in DMF (70%)

PBS  
171 mM NaCl  
3.4 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7.4

Transferpuffer  
48 mM Tris-HCl  
39 mM Glycin  
0.037% SDS  
20% Methanol



**2.1.12.9 Proteaseinhibitoren**

Lösung I	100 mM PMSF in Isopropanol
Lösung II	100 mM EDTA (Titriplex III) 100 mM $\epsilon$ -Aminocapronsäure 100 mM Benzamidin

**2.1.12.10 Löslichkeitstest und Ni-NTA-Affinitätschromatographie****Lysispuffer**

Puffer A	6 M GuHCl 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 8
Puffer B	6 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 8
Puffer C	PBS 0.1 % Triton X 1 Spatelspitze Lysozym pH 8

**Waschpuffer**

Puffer D	6 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 6.3
Puffer E	6 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 5.9
Puffer F	PBS pH 6.3
Puffer G	PBS pH 5.9

**Elutionspuffer**

Puffer H	6 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 4.5 bzw. 4.1
Puffer I	PBS pH 4.5
Puffer J	PBS pH 4.1

### 2.1.12.11 Dialyse

#### Dialysepuffer

1	4 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 5.5
2	3 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 6.5
3	2 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 7.4
4	1 M Harnstoff 0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.01 M Tris-HCl pH 7.4
5	PBS pH 7.4

### 2.1.12.12 GST-Affinitätschromatographie

Lysispuffer GST	jeweils 1 ml Proteaseinhibitoren ad 100 ml PBS pH 7.4
Elutionspuffer GST	50 mM Tris-HCl 10 mM red. Glutathion pH 8

### 2.1.12.13 ELISA

Beschichtungspuffer	13 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 35 mM $\text{NaHCO}_3$ pH 9.6
Blockierungspuffer	3% BSA in PBS
Phosphat-Citratpuffer (0.1M)	25.7 ml 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 24.3 ml 0.1 M Citronensäure pH 5
Phosphatase-Substratlösung	1 Tabl. Phosphatase Substrat 20 ml Beschichtungspuffer 0.1 mM $\text{MgCl}_2$
Stopplösungen	für AP-Konjugate: 0.1 M EDTA für POX Konjugate: 1M $\text{H}_2\text{SO}_4$
TMB-Substratlösung	1 Tabl. TMB 5 ml $\text{H}_2\text{O}$ 0.05 M Phosphat-Citrat-Puffer pH 5 0.006% $\text{H}_2\text{O}_2$



---

Waschpuffer	PBS/0.025% Tween
-------------	------------------

#### **2.1.12.14    Deglykosilierung von SsGesamtantigen**

Na-Acetat-Puffer	50 mM Na-Acetat pH 4.5
Deglykosilierungspuffer	30 mM NaIO <sub>4</sub> in Na-Acetat-Puffer
Reduktionspuffer	50 mM Na-Borhydrid in PBS pH 7.4

#### **2.1.12.15    Ellmann´s Assay**

Ellmann´s Reagenz	0.1% 5,5´-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) in PBS
-------------------	--

**2.1.12.16 Immunisierung der BALB/c-Mäuse**

STP-Adjuvans	0.4% Tween 20 1% Synperonic 10% Squalan in PBS
--------------	---

**2.1.12.17 Immunhistochemie**

Waschlösungen	0.1 M Tris-HCl pH 7.5  PBS/ 0.05% Tween
Blockierungslösung	10% FCS in PBS pH 7.4
Fixierlösung	2.5% Paraformaldehyd in PBS pH 7.3
Mowiol	7 g Glycerin 2.4 g Mowiol 6 ml dest. H <sub>2</sub> O 2 h rühren bei RT 12 ml 0.2 M Tris-HCl pH 8.5 1 h bei 50 °C
Peroxidase Substratlösung	100 µg Diaminobenzidin 0.01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ad 176 µl PBS pH 7.4

**2.1.12.18 Elektronenmikroskopie**

Fixierlösungen	
Lösung I	2% Glutaraldehyd 2% Paraformaldehyd in 0.1 M Na-Cacodylat pH 7.2
Lösung II	2% OsO <sub>4</sub> in 0.1 M Na-Cacodylat
Waschlösungen	
Lösung I	0.1 M Na-Cacodylat
Lösung II	0.05 M Na-Maleat pH 5.2

---

**Färbelösungen****Lösung I**

0.5% Uranyl Acetat  
in 0.05 M Na-Maleat

**Reynold'sche Lösung**

3.9% Bleinitrat  
5.9% Na-Citrat  
in 30 ml bidest. H<sub>2</sub>O lösen, schütteln  
nach 30 min 8 ml NaOH zufügen  
auf 50 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O auffüllen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Parasitenmaterial

#### 2.2.1.1 *Sarcoptes scabiei* var. *suis* und *Dermatophagoides pteronyssinus*

Sowohl die *Sarcoptes scabiei* var. *suis*- als auch die *Dermatophagoides pteronyssinus*-Milben wurden von der Afosa GmbH (Luckenwalde) als kryozertrümmertes Material, das bei - 80 °C gelagert wurde, zur Verfügung gestellt. Komplette *Sarcoptes*-Milben, die bei ebenfalls bei - 80 °C eingefroren waren, dienten als Ausgangsmaterial für die Southern Blot-Analyse.

#### 2.2.1.2 *Sarcoptes scabiei* var. *bovis*

Für die Immunhistochemie wurden *S. scabiei* var. *bovis*-Milben verwendet, die von der Merial GmbH (Rohrdorf) zu Verfügung gestellt wurden. Hautgeschabsel von infizierten Rindern wurden unter dem Binokular bei Beleuchtung für 20 min bei RT inkubiert, und die ausgewanderten Milben anschließend mit einem Haarpinsel eingesammelt.

#### 2.2.1.3 Herstellung von Antigenextrakt

Für die Gewinnung von Gesamtantigen aus den kryozertrümmerten Milben wurden diese in PBS aufgenommen und einer einminütigen Ultraschallbehandlung bei 60 W auf Eis unterzogen. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Milben 20 min bei 4 °C zentrifugiert (12.000 UpM) und der Überstand mit dem Antigen abgenommen. Das Antigen wurde bei - 20 °C gelagert, bis es im Western Blot oder im ELISA verwendet wurde.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 RNA-Isolierung

Sämtliche Mehrwegartikel, die für die RNA-Isolierung benötigt wurden, wurden vor Verwendung einer RNase-degradierenden Behandlung unterzogen. Zu diesem Zweck wurden Pipetten mit 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA und DEPC-H<sub>2</sub>O gesäubert. Gelelektrophoresetanks wurden mit 0.5% SDS behandelt und im Anschluss daran zunächst mit DEPC-H<sub>2</sub>O und dann mit 70% Ethanol ausgespült. Es wurden nur RNase freie Einwegartikel verwendet.

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung dienten ca. 20 mg kryozertrümmerte Milben, die nach der Lyse über QIAshredder Säulen (QIAGEN) homogenisiert worden waren. Die RNA von *S. scabiei* var. *suis* sowie von die von *D. pteronyssinus* wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (QIAGEN) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Das Grundprinzip dieser RNA-Isolierung basiert auf der selektiven Bindung von RNA > 200 bp an eine Silikat-Gel-Membran in stark denaturierendem Guanidin-Isothiocyanat Puffer. Die RNA wird abschließend in RNase-freiem destilliertem H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.2.2 Integrität der Gesamt-RNA

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde mittels der denaturierenden Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung der RNA überprüft. Unter elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nukleinsäuren ionisiert und die Polydesoxynukleotide liegen als Polyanion vor. Sie bewegen sich im elektrischen Feld von Kathode zu Anode, und diese Beweglichkeit ist im Wesentlichen von der Größe der DNA bzw. RNA abhängig. Die entsprechenden Banden der ribosomalen RNA (28 S und 18 S) sollten als deutliche Banden zu erkennen sein, was als Indiz für eine unterbliebende Degradierung der RNA während der Präparation gewertet wird.

0.6 g hochschmelzende Agarose (Roth) wurden mit 5 ml 10 x FA-Puffer versetzt, auf 50 ml Gesamtvolumen mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 65 °C wurden die Lösung mit 0.9 ml Formaldehyd sowie 1.5 µl Ethidiumbromid versetzt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid werden, auf Grund dessen interkalierenden Eigenschaft, Ribonukleinsäuren fluoreszenzmarkiert.

Nach Erstarren des Gels wurde dieses 30 min in 1 x FA- Laufpuffer equilibriert. 20 µl der RNA wurden mit 1 x RNA Ladepuffer versetzt, 3 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und anschließend damit das Gel beladen. Die RNA wurde bei 80 V nach Größe aufgetrennt und mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht. Es wurden nur die RNA-Isolate, bei denen im Gel zwei eindeutige Banden identifiziert werden konnten, für anschließende Zwecke weiterverwendet.

Die Qualität der RNA von *S. scabiei*, die für die Erstellung der cDNA-Phagen-Bank genutzt wurde, wurde zusätzlich im Bioanalyzer (Agilent) im Max-Planck-Institut (MPI) für Infektionsbiologie, Berlin geprüft.

#### **2.2.2.3 Reverse Transkription der *Dermatophagoides pteronyssinus*-mRNA**

Mittels der Reversen Transkriptase kann die mRNA unter Verwendung eines Poly-T-Primers in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Auf diese Weise können dann spezifische Transkripte in einem Organismus mittels einer PCR nachgewiesen werden. Zur Transkription der mRNA von *D. pteronyssinus* wurden ca. 5 µg der Gesamt-RNA mit 0.5 µg des Oligo-dT Primers versetzt und 10 min auf 70 °C erhitzt. Die Probe wurde 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend 120 pmol eines jeden Nukleotids sowie 1 x Erststrangpuffer (Promega) und 10 mM DTT zugegeben. Es folgte eine zweiminütige Inkubation bei 42 °C, bevor 200 U Reverse Transkriptase (Promega) zu dem Reaktionsansatz pipettiert wurden. Nach einer weiteren Inkubation bei 42 °C für 50 min wurde das Enzym 15 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die Qualität der cDNA wurde anschließend durch eine PCR mit spezifischen Primern für die Haushaltsgene Aktin und Triosephosphatisomerase überprüft (s. Punkt 2.2.2.7.1).

#### **2.2.2.4 cDNA-Bank**

Die cDNA-Bank von *S. scabiei* var. *suis* wurde kommerziell (Clontech BD Biosciences) hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente die mittels des RNeasy® Mini Kits (QIAGEN) isolierte Gesamt-RNA der Milben. Auch die Amplifikation der cDNA-Bank erfolgte kommerziell.

### 2.2.2.5 Isolierung und Restriktion genomischer DNA

Die genomische DNA (gDNA) von *S. scabiei*, die für die Detektion der „KE-reichen Antigene“ kodierenden Gene im Southern Blot benötigt wurde, wurde aus ca. 20 mg Milben isoliert. Zunächst wurden die Milben in Stickstoff zermörsert und dann in 1.5 ml Lysispuffer ü/N bei 50 °C verdaut. Das Lysat wurde für eine Denaturierung der Proteine mit der gleichen Menge Phenol versetzt, kurz geschwenkt und dann für 10 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und für eine weitere Reinigung der DNA mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach kurzem Schwenken wurde wiederum zentrifugiert und die DNA ü/N gegen die 1000fache Menge TE-Puffer bei 4 °C unter Rühren dialysiert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere Dialyse gegen 1 l TE<sub>low</sub>-Puffer für 3 h, um die Konzentration des EDTA möglichst niedrig zu halten. Die gDNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und *HindIII* jeweils 2 h bei RT verdaut. Der Versuchsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

15 µg gDNA

40 U Enzym

1 x Restriktionspuffer

Anschließend wurden 1/10 des Volumens 3 M Na-Acetat und 2.5 des Volumens eiskaltes Ethanol abs. zugegeben und die DNA ü/N bei - 20 °C gefällt. Es folgten eine Zentrifugation von 45 min bei 4 °C und ein anschließendes Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol. Die DNA wurde abschließend in 20 µl HPLC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und für den Southern Blot verwertet (s. Punkt 2.2.2.28).

### 2.2.2.6 Primer-Design

Bei der Primersynthese sollte im Allgemeinen ein Anteil an G/C-Nukleotiden von ca. 50% eingeplant werden. Des Weiteren wird eine optimierte Bindung der Primer an die DNA durch das Vorhandensein von ein bis zwei G/C-Nukleotiden am 3'-Ende des Primers ermöglicht, so dass das Risiko einer fehlerhaften Amplifikation verringert werden kann.

Für die spezifische Amplifikation von DNA-Sequenzen wurden Primer mit einer Länge von 12-30 Nukleotiden eingesetzt. Am 5'-Ende der Primer konnte für die

Klonierung der PCR-Fragmente eine Restriktionsstelle eingefügt werden. Ein weiteres überhängendes Ende aus zwei bis drei unspezifischen Nukleotiden am 5'-Ende ermöglichte ein effizientes Schneiden des PCR-Produktes durch das jeweilige Restriktionsenzym. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$T_m = \{22 + 1.46 * [(Anzahl A + Anzahl T) + 2 * (Anzahl G + Anzahl C)]\}$$

#### **2.2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR (Mullis und Faloona 1987) wurde zur Amplifikation von cDNA-Sequenzen aus Plasmiden und Transkriptionsansätzen sowie zur Überprüfung eines Transformationserfolges (Kolonie-PCR) eingesetzt. Sie wurde unter Verwendung der unter Punkt 2.1.9 aufgeführten PCR-Primern in dem Thermoblock MJ Research PTC-200 (BIOzym) in 50 µl-Reaktionsansätzen durchgeführt.

##### **2.2.2.7.1 PCR zur Kontrolle der Qualität der cDNA**

Die Qualität der cDNA wurde mittels einer PCR mit Primern, die die Haushaltsgene (housekeeping genes) Aktin und Triosephosphatisomerase amplifizieren, überprüft. Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

1x PCR Puffer  
1.5 mM  $MgCl_2$   
40 µM je dNTP  
je 50 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer  
1 U *Taq* DNA Polymerase  
0.5-5 ng cDNA

Zur Amplifikation des Aktin-Gens wurden die Primer CCE 104 und -105 verwendet, während das Triosephosphatisomerase-Gen unter Verwendung der Primer TPI 5' und -3' amplifiziert wurde.

Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min. Es folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Primer bei 54 °C und



1 min Extension bei 72 °C. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 10 min bei 72 °C.

#### **2.2.2.7.2 Kolonie-PCR**

Für die Detektion positiver Transformanten wurde die Hälfte einer putativ positiven *E. coli*-Kolonie in 10 µl dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. 5 µl dieser Suspension wurden dann in der jeweiligen PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm richteten sich nach den Bedingungen, unter denen auch die Klonierung der betreffenden Sequenz stattgefunden hatte.

#### **2.2.2.7.3 PCR zur Amplifikation der repetitiven Sonde für die DNA-Hybridisierung**

Die Sonde für die DNA-Hybridisierung wurde aus dem aufgereinigten PCR-Produkt des Klons *Ss-14* amplifiziert. Auf Grund der Tatsache, dass der Rückwärtsprimer innerhalb dieser Sequenz mehrfach bindet, konnte die Sonde mit der erwarteten Größe von 180 bp erst nach vier PCR-Durchläufen amplifiziert werden. Ein Reaktionsansatz enthielt die unter Punkt 2.2.2.7.1 aufgeführten Komponenten, mit der Ausnahme, dass 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 pmol eines jeden Primers eingesetzt wurden.

Zur Amplifikation wurden die Primer RepGA-F und RepGA-R verwendet. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min. Es folgten 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Anlagerung der Primer bei 55 °C und 30 s Extension bei 72 °C. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 5 min bei 72 °C. Nach der Auftrennung des PCR-Produktes im Agarosegel wurde der Bereich des DNA-Schmiers, von einer Größe < 500 bp aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA aufgereinigt (s. Punkt 2.2.2.10). Es folgte eine weitere PCR mit der aufgereinigten DNA und Aufreinigung der Produkte < 300 bp unter den oben genannten Bedingungen. Nach einer erneuten Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte eine weitere PCR mit den Ausnahmen, dass die Anlagerungstemperatur der Primer 54 °C betrug und lediglich 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> eingesetzt wurden. Dieses Produkt, dessen Größe zwar < 250 bp betrug, das allerdings noch nicht als klare Bande im Gel zu identifizieren war, wurde wiederum als aufgereinigtes Template in einer abschließenden PCR eingesetzt, in der ebenfalls

eine Anlagerungstemperatur von 54 °C gewählt wurde, die Konzentration des  $\text{MgCl}_2$  allerdings 2 mM betrug. Dieses Produkt wurde dann für eine Amplifikation und Sequenzierung in das Plasmid pGEM®-T Easy (Promega) (s. Punkt 2.2.2.14) ligiert.

#### **2.2.2.7.4 PCR zu Amplifikation der repetitiven Sequenzen aus *D. pteronyssinus***

Mittels einer PCR sollte untersucht werden, ob die für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Transkripte, die in den *Sarcoptes*-Milben gefunden worden waren, auch in den Hausstaubmilben nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet. Ein PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie unter Punkt 2.2.2.7.1 beschrieben zusammen, abgesehen davon, dass die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen zwischen 1.5 und 3 mM lagen, und 10 pmol von jedem Primer verwendet wurden.

Es wurden hier die Primerkombinationen Ss14F/RepGA-R, Ss-18F/RepGA-R, und RepGA-F/Ss14R sowie Ss14F/Ss14R und Ss18F/Ss14R verwendet. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min. Es folgten 35 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Primer bei 55-58 °C und einer Extension bei 72 °C für 1 min. Am Ende des letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 5 min bei 72 °C.

#### **2.2.2.7.5 PCR zur Kontrolle der Insertionen in pTriplEx2**

Die Größe der Insertionen der identifizierten Klone in dem Plasmid pTriplEx2 wurde durch eine PCR mit den phagenspezifischen Primern TriplEx5' und TriplEx3' ermittelt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie unter Punkt 2.2.2.7.1 beschrieben zusammen, abgesehen davon, dass nur 10 pmol je Primer für die PCR verwendet wurden. Die PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min. Es folgten 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C und 4 min Anlagerung der Primer sowie Extension bei 68 °C. Am Ende des letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 10 min bei 72 °C.

#### **2.2.2.7.6 PCR zur Amplifikation der immunreaktiven Gene von *S. scabiei***

Für die Expression und Aufreinigung der immunreaktiven Antigene mussten die in das Plasmid pTriplEx2 inserierten Fragmente in Expressionsvektoren umklontiert werden. Zu diesem Zweck wurden diese jeweils durch eine PCR mit Primern, die am

5'- und 3'-Ende eine Restriktionsstelle für eine anschließende Klonierung trugen, amplifiziert. Der Reaktionsansatz für die Klone Ss-7, -14, -18, -23, -37, -97 setzte sich wie unter Punkt 2.2.2.7.5 beschrieben zusammen.

Der Reaktionsansatz für die Klone Ss-4 und -17 setzte sich mit Ausnahme der Konzentration des  $\text{MgCl}_2$  (2.5 mM) gleichermaßen zusammen, ebenso wie für den Klon Ss-134, bei dem der PCR-Ansatz 3 mM  $\text{MgCl}_2$  enthielt.

Die PCR für den Klon Ss-4 begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min. Es folgten 35 Zyklen mit 45 s Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Primer bei 55 °C und 1 min Extension bei 72 °C. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 5 min bei 72 °C. Die PCR für die Klone Ss-7, -17, -97, -14, -18 und -23 verlief unter den gleichen Bedingungen mit der Ausnahme, dass die Anlagerungstemperatur der Primer für erstere Klone 59 °C betrug, während sie für Ss-14, -18, -23 bei 69 °C lag.

Die PCR für den Klon Ss-37 begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 1 min. Es folgten 25 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Primer bei 59 °C und 1 min Extension bei 72 °C. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 10 min bei 72 °C.

Die PCR für den Klon Ss-134 begann mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min. Es folgten 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Anlagerung der Primer bei 65 °C und 1 min Extension bei 72 °C. An den letzten Zyklus schloss sich ein Extensionsschritt von 5 min bei 72 °C.

#### **2.2.2.8 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

Die Methode der RACE-PCR (Frohman et al. 1988) ermöglicht die Vervollständigung von Sequenzen, deren 5'- bzw. 3'-Enden unbekannt sind.

Für die Aufklärung des 5'-Bereichs der für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Sequenzen wurde der BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit sowie der BD Advantage™ 2 PCR Kit (BD Biosciences) benutzt. In der SMART-Technologie wird eine Reverse Transkriptase verwendet, die eine terminale Transferase Aktivität entwickelt, durch die an das 3'-Ende der cDNA drei bis fünf Cytosine (C) angehängt werden. Ein Primer, der an seinem 3'-Ende drei Guanine (G) enthält, lagert sich an diese C-reiche Region und dient dann als erweitertes Template für die Reverse Transkription.

Es wurden 900 ng Gesamt-RNA von *S. scabiei* für die Reaktion der Transkription eingesetzt. Die Durchführung dieses Versuchs erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Die anschließende PCR wurde ebenfalls nach Vorgaben des Herstellers mit Hilfe des BD Advantage™ 2 PCR Kits durchgeführt. Hier wurden die Primer RACE5'-Ss18R und GArep5'RACE-R als Rückwärtsprimer verwendet.

#### **2.2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese mit DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente für analytische und präparative Zwecke wurden in Agarosegelen nach Größe aufgetrennt. Für die Präparation der Agarosegele wurde 1% hochschmelzende Agarose (Roth) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und dieser Lösung nach Abkühlen 1.5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Die DNA-Proben wurden mit Farbstoffschwerelösung (6 x Agarose-Ladepuffer) versetzt und im Vergleich zu einem DNA-Standard (Rapidozym) zur Bestimmung der Fragmentgröße auf das Gel getragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 120 V in TAE-Puffer.

#### **2.2.2.10 Isolation von DNA-Fragmenten**

Die Isolierung von PCR-Fragmenten wurde mittels des NucleoSpin® Extraction Kits (Macherey & Nagel) entsprechend der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Methodik dieses Kits beruht auf der selektiven Bindung der DNA an eine Silikatmembran unter Hochsalz- und einer abschließenden Elution unter Niedrigsalzbedingungen (dest. H<sub>2</sub>O).

Lediglich das PCR-Produkt der Sonde, die für die Durchführung der DNA-Hybridisierung und des Southern Blots synthetisiert wurde, wurde mit Hilfe des NucleoTrap® Gel Extraction Kit (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Dieses PCR-Produkt mit einer Länge von 180 bp war zu klein, um in genügenden Mengen über die Membran aufgereinigt zu werden. Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf der reversiblen Bindung von DNA an eine speziell aktivierte Matrix (Suspension) in Gegenwart von chaotropen Salzen. Selbst kurze Fragmente mit einer Länge von 20-50 bp können bis zu 50% unter Niedrigsalzbedingungen zurück gewonnen werden.

### **2.2.2.11 Isolation von Plasmid-DNA**

#### **2.2.2.11.1 Extraktion im kleinen Maßstab**

Plasmid-DNA im kleineren Maßstab wurde mittels des NucleoSpin® Mini Plasmid Kits (Macherey & Nagel) gewonnen. Die Extraktion erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf der Lyse von plasmidtragenden Bakterienzellen aus einer Kultur von bis zu 5 ml. Die Inkubationszeit garantiert eine Freisetzung der Plasmid-, nicht aber der chromosomalen DNA. Nach Zugabe des salzhaltigen Neutralisationspuffers wird das im Lysepuffer enthaltene SDS und die daran gebundenen Komponenten gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wird auf die DNA bindende aktivierte Silikat-Membran gegeben und in dest. H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.2.2.11.2 Extraktion im mittleren Maßstab**

Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wurde mit Hilfe des NucleoBond® Midi Plasmid Kits (Macherey & Nagel) nach Vorgaben des Herstellers isoliert. Auf diese Weise kann Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur bis zu 50 ml gewonnen werden. Die Plasmid-DNA wird über seine Phosphatgruppen an die Anion-Austausch-Membran gebunden und ebenfalls in dest. H<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.2.12 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA und RNA in Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäurepräparation wurde durch den Quotienten der Extinktionsmessung von 260 nm/280 nm bestimmt, der für eine proteinfreie DNA-Lösung bei 1.8 und für eine reine RNA-Lösung bei 2.0 liegen sollte. Der Quotient der Extinktionswerte von 260 nm/230 nm hingegen gibt den Grad der Kontamination durch Kohlenhydrate, Peptide, Phenol oder aromatische Komponenten an, und sollte für beide Präparationen bei 2.2 liegen. Beide Werte gelten für neutrale Lösungen.

### **2.2.2.13 Restriktionsverdau von Vektoren und DNA-Fragmenten**

Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Unter Verwendung dieser Enzyme können DNA-Fragmente gerichtet kloniert werden.

Für den Restriktionsverdau wurden 2-10 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 10-20 µl mit 10-20 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen und den dazu gehörenden Puffern versetzt. Die Inkubationsdauer und -temperatur sowie die Zugabe von BSA wurden nach Vorgaben des Herstellers für das betreffende Enzym festgelegt. Vor der Aufreinigung wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel nach Größe aufgetrennt oder direkt, wenn keine anderen DNA-Fragmente in dem Ansatz zu erwarten waren, über eine Silikat-Membran aufgereinigt (s. Punkt 2.2.2.10).

#### **2.2.2.14 Ligation von DNA**

In Gegenwart von DNA-Ligasen können DNA-Fragmente durch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei benachbarten Nukleotiden miteinander verknüpft werden.

Die Gene oder Genfragmente, die in den Plasmiden pET (Novagen) oder pQE (QIAGEN) exprimiert werden sollten, wurden nach vorhergegangener Restriktion mit den entsprechenden Enzymen in 10-20 µl Reaktionsansätzen mit den jeweiligen Plasmiden ligiert, die ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen geschnitten worden waren.

Die Menge des zu inserierenden Fragmentes errechnete sich aus folgender Formel:

$$(100 \text{ ng Vektor} \times \text{kb Insert} / \text{kb Vektor}) \times 5 = \text{ng Insert}$$

Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

ca. 100 ng Vektor  
x ng Insert  
1x T4 Ligationspuffer  
400 U T4 Ligase

Die Ligation erfolgte 2 h bei RT oder ü/N bei 16 °C. Die Klone Ss-4, -7, -14, -17, -18, -23, -37, -97, -128 und -134 wurden zur Expression der Gene in das Plasmidsystem pQE-30 (QIAGEN) kloniert. Eine Klonierung in die Expressionssysteme pET-28 und pET-41a (+) (Novagen) erfolgte außerdem noch für die Klone Ss-14 und -18.

Die Fragmente, die in den Vektor pGEM®-T Easy (Promega) inseriert wurden, wurden ebenfalls unter den oben beschriebenen Bedingungen ligiert, allerdings ohne eine vorangegangene Restriktion der DNA. Die *Taq* Polymerase produziert in der PCR keine glatten Enden, sondern schafft in der Mehrzahl der Fälle einen unspezifischen Überhang von einer Base, die meist ein Adenin ist. Auf Grund dieser Eigenschaft können Fragmente in Vektoren mit einem sog. T-Überhang, wie der pGEM®-T Easy, ohne vorangegangene Restriktion effizient ligiert werden.

Des Weiteren wurde die Ligation in diesem System ü/N bei 4 °C durchgeführt.

#### **2.2.2.15 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien**

Die meisten Bakterienarten nehmen DNA nur im begrenzten Umfang auf. Aus diesem Grund können sie, um wirksam transformiert zu werden, einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterzogen werden.

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durchgeführt. Der betreffende Bakterienstamm wurde über Nacht in LB-Medium angezogen und im Verhältnis 1/100 in SOB-Medium überimpft. Bei einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von ca. 0.6 wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (2500 x g, 10 min, 4 °C). Das Bakterienpellet einer 200 ml-Kultur wurde in 64 ml kaltem TB-Puffer resuspendiert und nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 min erneut pelletiert. Die Zellen wurden dann in 16 ml TB-Puffer aufgenommen und unter Rühren mit 7% DMSO versetzt. Es folgte eine erneute Inkubation von 10 min auf Eis, bevor die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert wurden.

#### **2.2.2.16 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien mit Plasmid-DNA**

200 µl transformationskompetente *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-10 µl eines Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Auf einen Hitzeschock bei 42 °C für 90 s folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Die Bakterien wurden anschließend in 800 ml SOC-Medium bei 45 min bei 37 °C geschüttelt und dann auf dem geeigneten Selektivmedium ausplattiert. Nach einer Inkubation ü/N bei 37 °C konnte es so zu einer Ausbildung Plasmid-tragender Kolonien kommen.

Die Plasmide pGEM®-T Easy (Promega) wurden in *E. coli* JM109 und die Plasmide pQE-30, -31, -32 (QIAGEN) in *E. coli* XL1Blue kloniert. Dahingegen wurden die

Plasmide pET (Novagen) zunächst in *E. coli* BL21DE und erst anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Dieser Schritt beruht auf der Tatsache, dass das besondere Merkmal des pET-Expressionssystems die minimale Hintergrund-Expression bei Abwesenheit der T7 RNA-Polymerase ist, da die Wirtspolymerase nicht an den T7 Promotor bindet. Außerdem liegt die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors in einer Region, die durch die Leseaktivität der bakteriellen Polymerase äußerst schwach, wenn überhaupt, transkribiert wird. So wird vom Hersteller empfohlen, die Plasmide für größere Ausbeuten zunächst in *recA*<sup>-</sup>*endA*<sup>-</sup>-Stämme zu transformieren, da unter diesen Umständen ein schwaches Wachstum der Zellen oder eine Instabilität des Plasmids durch die basale Expression vermieden werden kann.

#### **2.2.2.17 Identifizierung positiver Transformanden**

Positive Transformanden, die das Plasmid pQE oder pET 28 bzw. 41a (+) mit der gesuchten inserierten DNA-Sequenz trugen, wurden zunächst durch eine Kolonie-PCR identifiziert (s. Punkt 2.2.2.7.2). Im Falle eines positiven Signals wurde die verbliebende halbe Bakterienkolonie in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen und nach einer Plasmidpräparation ein Restriktionsverdau unter Verwendung der entsprechenden Restriktionsenzyme durchgeführt. Stimmte die Größe der inserierten Sequenz mit der zu erwartenden überein, wurde die Identität zusätzlich durch eine Sequenzierung bestätigt.

Positive Transformanden, die das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) trugen, konnten durch ein Blau/Weiß-Screening identifiziert werden. Dieses Plasmid trägt eine MCS, die in die  $\alpha$ -Peptid kodierende Region des Enzyms  $\beta$ -Galactosidase inseriert ist. Eine insertionale Inaktivierung des Peptids ermöglicht eine direkte Identifizierung rekombinanter Klone durch eine Farb-Differenzierung auf Indikatorplatten. Nach Zusatz von X-Gal und IPTG kommt es nur in Klonen, die das intakte  $\beta$ -Galactosidase-Gen enthalten, zur Expression des Enzyms. Dieses setzt das X-Gal als Substrat in einer blauen Farbreaktion um. Die weißen Kolonien wurden zunächst durch eine Kolonie-PCR auf Insertion geprüft und anschließend durch Restriktion bestätigt.



#### **2.2.2.18 Langzeitlagerung von Bakterienstocks**

Bakterienstocks für die Langzeitlagerung wurden aus einer ü/N-Kultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Zusatz von Antibiotika angelegt. Ein Aliquot der Kultur wurde mit 7% Glycerin versetzt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.2.19 Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach Aufreinigung (s. Punkt 2.2.2.10) von der Firma AGOWA (Berlin) nach dem Didesoxynukleotid-Verfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Dieses automatisierte Sequenzierverfahren basiert auf dem Einbau nukleotidspezifischer Farbstoffe während der Sequenzierreaktion, die nach Anregung durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge emittieren. So können die Reaktionsprodukte bereits während der Auftrennung mit einem auf die Farbstoffe adaptierten laseroptischen System detektiert werden. Die Lichtsignale werden automatisch ausgewertet. Die Gen- und Proteinsequenzen wurden mittels des Computerprogramms MacVector (Accelrys) analysiert.

Epitopbestimmende Aminosäuren wie polare oder solche mit großen Seitenketten beeinflussen die immunogene Potenz der Epitope. Des Weiteren sollten immunogene Abschnitte mit eher hydrophilen Aminosäuren für die Erkennung exponiert auf der Oberfläche des Moleküls liegen. Diese Epitope sind flexibel und weisen keine  $\beta$ -Struktur auf. Die Aminosäuren Glycin und Prolin, die hier gehäuft auftreten, führen zu einer Umkehr des Verlaufs der Polypeptidkette. Die potenzielle Immunogenität der rekombinanten Proteine wurde anhand dieser Parameter (MacVector, Accelrys) ermittelt.

#### **2.2.2.20 Datenbank-Abgleich**

Die sequenzierten Klone wurden durch einen Datenbank-Abgleich unter Gebrauch des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) näher charakterisiert. Die Sequenzen wurden zunächst durch einen BLASTX-Abgleich, in dem Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen drei Leserahmen translatiert werden und mit Proteinen in öffentlichen Datenbanken verglichen werden, untersucht. Zusätzlich wurden die

Nukleotidsequenzen mit den öffentlich zugänglichen Nukleotidsequenzen und denen der Expressed Sequence Tag (EST)-Datenbank (BLASTN) abgeglichen. In einer BLASTP-Analyse, in der Proteine untereinander verglichen werden, konnten konservierte Domänen detektiert werden. Sequenzanalysen von Klonen, die Anhäufungen bestimmter Aminosäuren aufwiesen, wurden unter Berücksichtigung geringer Komplexität durchgeführt. Der E-Wert (Expect value), der in diesen Analysen angegeben wird, ist ein Parameter, das die Anzahl der Treffer beschreibt, die zufällig erwartet werden können, wenn eine Datenbank einer bestimmten Größe durchsucht wird. Je näher dieser Wert bei „0“ liegt, desto größer ist die Signifikanz des jeweiligen Treffers.

#### **2.2.2.21 Identifizierung von Signalpeptiden**

Eukaryotische, sekretorische Proteine werden in der eukaryotischen Zelle durch ihr Signalpeptid für eine spätere Passage in den sekretorischen Stoffwechsel zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) geleitet. Werden diese Gene heterolog in *E. coli* exprimiert, kann die Assoziation oder Inkorporation des Proteins in die Membran einen toxischen Effekt auf die Zelle haben.

Aus diesem Grund wurden die identifizierten immunreaktiven Klone auf das Vorhandensein von Signalpeptiden untersucht (SignalP Server: [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/); Nielsen und Krogh 1998). Mit Hilfe der SignalP-Methode kann die Existenz klassischer Signalpeptide, die am weitesten verbreitet sind und durch die Signal Peptidase I (SPase) gespalten werden, vorhergesagt werden. Die Antigene wurden ohne Signalpeptid kloniert.

#### **2.2.2.22 *in vivo*-Exzision**

Die MCS des  $\lambda$ TriplEx2-Phagemids ist innerhalb eines Plasmids lokalisiert, das wiederum in dem Phagengenom liegt und durch *loxP*-Stellen flankiert wird. Die Überführung des  $\lambda$ TriplEx2-Phagemids in einen *E. coli*-Stamm, der die Cre-Recombinase exprimiert, resultiert in der Freisetzung an den *loxP*-Stellen und einer anschließenden Zirkularisierung des Plasmids. Für die Bestimmung der Spezifität und der damit verbundenen Expression der immunreaktiven Klone in Flüssigkultur sollten die Plasmide aus den Phagen exzisiert werden.

*E. coli*-Bakterien des Stammes BM25.8 exprimieren die Cre-Recombinase bei Wachstumsbedingungen von 31 °C. Diese Bakterien wurden auf LB/Chloramphenicol/Kanamycin-Platten ausplattiert, bei 31 °C ü/N inkubiert und für den weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert. Für die sog. *in vivo*-Exzision wurde von dieser Platte eine einzelne Kolonie auf LB/MgSO<sub>4</sub>/Chloramphenicol/Kanamycin-Platten überimpft und ebenfalls bei 31 °C ü/N inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde dann in 10 ml LB-Medium überführt, die Bakterien bei 31 °C bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 1-1.4 wachsen lassen und mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt. Ein Phagenklon wurde von einer Platte ausgestochen und die Phagen 3-4 h in 350 µl 1 x λ-Dilution-Buffer auswandern lassen. Für die Exzision des Plasmids wurden 200 µl der Bakterienkultur mit 150 µl des Phageneluats kombiniert und 30 min bei 31 °C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zugefügt und die Kultur eine weitere Stunde bei 31 °C geschüttelt. 10 µl der infizierten Zellsuspension wurden auf LB/Ampicillin Platten ausplattiert und ü/N bei 37 °C inkubiert. Von den Platten wurden einzelne Kolonien für Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (s. Punkt 2.2.2.11.1) isoliert, und die Größe der Insertionen nochmals durch PCR überprüft. Für eine Expression der Antigene folgte eine Transformation von *E. coli* XL1Blue mit den jeweiligen Plasmiden (s. Punkt 2.2.2.16).

### **2.2.2.23 Expression der Gene in Flüssigkultur**

#### **2.2.2.23.1 Genexpression in pTriplEx2 zur Detektion *Sarcoptes*-spezifischer Klone**

Die im Immunoscreening isolierten Antigene sollten auf eine spezifische Reaktion mit *Sarcoptes*-positiven Seren, im Vergleich zu *Sarcoptes*-negativen und denen von Hausstaubmilbenallergikern, geprüft werden. Zu diesem Zweck wurde aus einer ü/N Kultur der Klone in LB-Medium/Ampicillin 200 µl entnommen und in 5 ml LB-Medium/Ampicillin überimpft. Nach ca. 2 h Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 UpM war eine OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8 erreicht, und die Genexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h weiterer Inkubation wurde die Expression durch das Auftragen der entnommenen Proben vor bzw. nach Induktion auf dem SDS-Gel überprüft und anschließend im Western Blot auf die Reaktion mit den entsprechenden Seren überprüft (s. Punkt 2.2.4.4.1).

### **2.2.2.23.2 Genexpression im Expressionssystem pQE**

#### **2.2.2.23.2.1 Löslichkeitstest**

Bei einer Überexpression in Bakterien kann es zu der Bildung von Proteinaggregaten (inclusion bodies) kommen. Proteine, die im Überschuss vorliegen und nicht verwertet werden können, werden so von den Zellen eingeschlossen. Unter diesen Umständen können rekombinante Proteine nicht unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden. Die Bedingungen, unter denen die hier vorliegenden rekombinanten Proteine aus den Bakterienzellen isoliert werden konnten, wurden durch die Durchführung eines Löslichkeitstest ermittelt. Zu diesem Zweck wurde das Bakterienpellet einer induzierten 500 ml Kultur gedrittelt und die Zellen jeweils in Puffer A, B und C aufgenommen.

Die Menge (ml) des eingesetzten Puffers (y) errechnete sich aus folgender Formel:

$$(OD_{600} \times 40) / 2 = y$$

Die Zellen, die in Puffer C unter nativen Bedingungen resuspendiert worden waren, wurden durch eine Ultraschallbehandlung (3 min bei 60 Watt) und ein anschließendes dreimaliges Schockfrieren im Ethanol-Eisbad und Auftauen unter lauwarmen Wasser lysiert. Die Zellen in Puffer A und B hingegen wurden durch Rühren mit dem Magnetrührer bis zu einer Klärung der Lösung aufgeschlossen. Die Zellrückstände wurden dann 30 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert und das Pellet in der gleichen Menge des entsprechenden Puffers aufgenommen. Durch die Analyse auf dem SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung (s. Punkt 2.2.2.26) wurde ermittelt, unter welchen Bedingungen das rekombinante Protein in den Überstand entlassen wurde.

#### **2.2.2.23.3 Expression und Aufreinigung der Proteine**

Die in das Expressionssystem pQE 30,-31 und -32 (QIAGEN) klonierten Gene oder Genfragmente wurden für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine unter folgenden Bedingungen als 6-Histidin-Fusionproteine exprimiert:

Aus einer Bakterien-ü/N-Kultur in LB-Medium/Ampicillin wurden 20 ml auf 500 ml LB-Medium/Ampicillin/1% Glucose überimpft. Durch die Zugabe der Glucose wird die

basale Expression in diesem System unterdrückt. Nach dem Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0.6-0.8 wurden die Gene oder Genfragmente durch die Zugabe von IPTG in einer Konzentration von 0.1, 0.5 und 1 mM zur Expression induziert. Nach einer Induktion im Schüttelinkubator von 3 h bei 37 °C und 220 UpM wurden die Zellen durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 UpM geerntet.

Für die anschließende Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen unter den Bedingungen, die sich im Löslichkeitstest (s. Punkt 2.2.2.23.2.1) für das betreffende Protein als optimal erwiesen hatten, lysiert. Über die Histidin-Fusion am N-Terminus folgte die Bindung des rekombinanten Proteins an ein  $Ni^{2+}$ -Säulenmaterial.

Der Überstand des Zelllysats wurde zweimal auf 1 ml Ni-NTA-Matrix (QIAGEN), die vorher mit dem entsprechenden Lysispuffer äquilibriert worden war, pipettiert. Es folgten drei Waschschrte: Die Matrix, auf die Lysate in Puffer A und B geladen worden war, wurde jeweils mit 10 ml des jeweiligen Lysispuffers und anschließend mit 10 ml des Puffer D und E gewaschen, bevor die gebundenen Proteine mit 5 ml des Puffers H eluiert wurden. Die Matrix, auf die Bakterien-Lysate in Puffer C pipettiert worden war, wurde zunächst mit 10 ml des Lysispuffers und anschließend jeweils mit 10 ml der Puffer F und G gewaschen. Eine Elution des Proteins erfolgte in 5 ml Puffer J. Das Volumen aller Elutionsfraktionen betrug 0.5 ml.

#### **2.2.2.23.4 Expression im System pET und Aufreinigung der Proteine**

##### **2.2.2.23.4.1 Expression pET-28**

Die Klone *Ss-14* und *Ss-18* wurden in das Expressionssystem pET28 kloniert. Die Genexpression wurde, wie unter Punkt 2.2.2.23.3 beschrieben, durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das Medium enthielt hier keine Glucose, da in diesem System keine basale Expression auftritt.

##### **2.2.2.23.4.2 Expression und Aufreinigung in pET-41a (+)**

Das Expressionssystem pET-41 ermöglicht durch die Fusion des klonierten Fragmentes mit dem löslichen Protein Glutathion-S-Transferase (GST) am N-Terminus eine native Aufreinigung des Fusionsproteins.

Die Klone *Ss-14* und *Ss-18* wurden in das Expressionssystem pET-41a (+) kloniert. Durch die Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Genexpression induziert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte, wie unter Punkt 2.2.2.23.2.1 beschrieben, unter nativen Bedingungen in dem Lysispuffer GST.

Das rekombinante Protein wurde anschließend über eine Glutathion-Matrix aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde 1 ml Matrix zunächst mit 20 ml eiskaltem PBS pH 7.4 gewaschen und anschließend 30 min schwenkend mit der Proteinlösung inkubiert. Nach Ablaufen des Überstandes wurde die Matrix mit 20 ml PBS gewaschen und das Protein in 4 ml Elutionspuffer GST (0.5 ml-Fractionen) eluiert.

#### **2.2.2.24 Proteinfällung mit Trichloressigsäure**

Proteine, die Guanidiniumpuffer gelöst waren oder solche, die aufkonzentriert werden mussten, wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Zu diesem Zweck wurden die Probe mit 5% TCA versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation von 30 min bei 4 °C und 13.000 UpM. Das Protein-Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem Ethanol abs. gewaschen, getrocknet und das Protein in PBS gelöst.

#### **2.2.2.25 SDS-PAGE**

Proteine werden bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) in Gegenwart von 0.1% SDS entsprechend ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode aufgetrennt. Die Polypeptide werden bei der Probenaufbereitung in SDS-Probenpuffer hitzedenaturiert. Der Zusatz des anionischen Detergenz bewirkt eine Überlagerung der Eigenladung der Proteine, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (Gassen und Schrimpf 2002).

Die SDS-Gele wurden in der unter Punkt 2.1.12.4 beschriebenen Zusammensetzung gegossen und die Proteine in vertikalen Elektrophorese-Apparaturen (Hoefer) in der diskontinuierlichen Elektrophorese bei 120 V nach Größe und Ladung aufgetrennt.

**2.2.2.25.1 Probenaufbereitung von aufgereinigtem Protein**

Die aufgereinigten Proteine wurden mit 1 x Ladepuffer versetzt, die Proben 5 min bei 95 °C hitzedenaturiert und kurz abzentrifugiert, bevor sie auf das Gel geladen wurden.

**2.2.2.25.2 Aufbereitung der Proben aus der Genexpression**

Aus der Bakterienkultur wurde 1 ml entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einer Menge (µl) PBS (y) aufgenommen, die sich nach folgender Formel berechnete:

$$(\text{OD}_{600} \times 50) / 0.6 = y$$

Nach Zugabe des Probenpuffers wurden die Proben wie oben beschrieben erhitzt und das Zelllysate anschließend 5 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert. 15 µl des Überstandes pro Spur wurden auf das Gel geladen.

**2.2.2.26 Coomassie-Färbung**

Die Proteine wurden nach Auftrennung im SDS-Gel durch eine Inkubation von 1 h bei 60 °C in Coomassie-Färbelösung und einer anschließenden Entfärbung des Geles in Coomassie-Entfärbelösung sichtbar gemacht.

### **2.2.2.27 DNA-Hybridisierung**

Mit allen im Immunoscreening identifizierten Klonen wurde eine DNA-Hybridisierung mit Hilfe des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) durchgeführt. Hier werden DNA-Sonden, die mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) markiert sind, für eine Hybridisierung genutzt, so dass in einer nachfolgenden Enzymreaktion die Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Für die DNA-Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde von 161 bp Länge, bestehend aus 43 bp der konservierten GA-repetitiven Sequenz und 118 bp des konservierten Bereichs, der stromaufwärts der repetitiven Sequenz liegt, verwendet (s. Punkt 7.4.10). Mit allen im Immunoscreening isolierten Klonen wurde unter Gebrauch der GA-repetitiven Sonde eine DNA-Hybridisierung durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Anzahl der Klone, die die repetitiven Sequenzen enthalten, ermittelt werden, ohne dass eine Sequenzierung durchgeführt werden musste.

#### **2.2.2.27.1 Markierung der Sonde mit DIG High Prime**

Für die Markierung der Sonde mit DIG wurden ca. 700 ng des aufgereinigten PCR-Produktes in 16 µl dest. H<sub>2</sub>O 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. 4 µl der DIG High Prime-Markierungslösung wurden zugegeben und der Ansatz ü/N bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen auf 65 °C für 10 min beendet.

#### **2.2.2.27.2 Spot-Test zur Quantifizierung der Markierungsausbeute**

Die Markierungsreaktion der DIG-markierten Sonde wurde durch Auftragen einer Verdünnungsreihe im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe von DIG-markierter Kontroll-DNA nach Vorgaben des Herstellers überprüft. Die Detektion der Markierung erfolgte wie unter Punkt 2.2.2.27.3 beschrieben. Auf Grund der geringen Konzentration der DIG-markierten Sonde wurde für die Detektion der Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, der gesamte Markierungsansatz in 10 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und für die DNA-Hybridisierung verwendet.



### 2.2.2.27.3 Detektion der „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klone

Für die Detektion der Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, wurden je 1 µg des exzisierten Plasmids auf eine mit 5 x SSC angefeuchtete Nylonmembran (Pall) pipettiert und diese getrocknet. Die DNA wurde durch die Positionierung der Membran mit der DNA-Seite nach oben auf mit Denatierungspuffer durchtränktem Whatmanpapier denaturiert (15 min). Anschließend erfolgte eine zweimalige Neutralisation von jeweils 15 min auf mit Neutralisationspuffer durchtränktem Whatmanpapier, bevor die Membranen erneut getrocknet und dann durch UV-Crosslinking fixiert wurden. Nach einer 45minütigen Prähybridisierung bei 38 °C im Prähybridisierungspuffer wurden die Membranen über Nacht bei 38 °C mit der Sonde im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen mit 2 x SSC/0.1% SDS und anschließend zwei Mal mit 0.5 x SSC/0.1% SDS jeweils 5 min gewaschen. Es folgte ein Waschschrift von 3 min mit dem Waschpuffer, bevor unspezifische Bindungsstellen für 30 min mit dem Blockierungspuffer blockiert wurden. Daran schlossen sich eine Inkubation von 30 min mit dem anti-DIG-Antikörper (1/10000 in Blocklösung) und zwei Waschschriffe von jeweils 15 min mit dem Waschpuffer. Die Membranen wurden 2 min im Detektionpuffer äquilibriert und dann in die mit Frischhaltefolie ausgelegte Entwicklungskammer gelegt. Jeweils 1 ml Substratlösung (1/100 CSPD (Roche) in Detektionspuffer) wurde auf die Membranen gegeben, nach ca. 5 min der Röntgenfilm aufgelegt und die Kammer geschlossen. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion auf dem Röntgenfilm durch kurzes Schwenken in Entwicklungslösung, kurzes Waschen in dest. H<sub>2</sub>O und einer abschließenden Fixierung in Fixierlösung sichtbar gemacht. Alle Reaktionsschritte wurden, wenn nicht anders benannt bei RT durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Klon *Ss-14* und als Negativkontrolle der Klon *Ss-37* verwendet, deren Identität durch eine vorangegangene Sequenzierung ermittelt worden war.

### 2.2.2.28 Southern Blot

Anhand der Southern Blot-Analyse können im Gel aufgetrennte DNA-Fragmente auf einer Membran fixiert und diese mittels der Hybridisierung mit einer entsprechenden Sonde spezifisch nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte zum einen die Kopienzahl der Gene in *S. scabiei*, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, detektiert und außerdem ermittelt werden, ob entsprechende Gene auch im Genom

von *D. pteronyssinus* vorhanden sind. Auch hier wurde das DIG-System (Roche) (s. Punkt 2.2.2.27) verwendet. Nach der Restriktion von 15 µg gDNA von *S. scabiei* und *D. pteronyssinus* (s. Punkt 2.2.2.5) wurde diese auf ein 0.8%iges Agarosegel getragen und ca. 45 min bei 120 V nach Größe aufgetrennt. Sowohl die Gelvorbehandlung als auch der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die weiteren Schritte zur Denaturierung, Neutralisation und Fixierung der DNA sowie der Hybridisierung und Entwicklung erfolgten wie unter Punkt 2.2.2.27.3 beschrieben.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Synthetische Peptide

Aus drei konservierten Bereichen der repetitiven Proteine wurden Sequenzen ausgewählt und Peptide synthetisiert. Für die Kopplung an das Maleimid aktivierte Trägerprotein Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) wurde ein Cystein an den N-Terminus der Peptide gefügt, mit dem die Maleimidgruppe des Trägermoleküls reagiert.

### 2.2.3.2 Kopplung der Peptide an KLH

Kleine Moleküle (Haptene) wie Peptide sind nicht in der Lage eine Immunantwort zu stimulieren, obwohl eine Interaktion mit Produkten der Immunantwort möglich ist. Diese Haptene können aber durch eine Kopplung an Trägerproteine vollständig immunogen gemacht werden. Als Trägermoleküle eignen sich hier das Bovine Serum Albumin (BSA), das Ovalbumin (OVA) sowie das Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), von denen sich das KLH auf Grund seiner großen Molekülmasse (MW von  $4.5 \times 10^5$  bis zu  $1.3 \times 10^7$ ), der starken Immunogenität und seines hohen Anteils (6%) an freien Lysinen besonders eignet.

Die synthetischen Peptide wurden unter Verwendung des Imject® Maleimide Activated mKLH Kits (Pierce) an das aktivierte KLH gekoppelt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers. Die Eluate wurden in 0.5 ml-Fraktionen aufgefangen, deren Proteinkonzentration anschließend im BCA gemessen wurde.

### 2.2.3.3 Quantifizierung der Konjugation durch den Ellmann's Assay

Die Effizienz der Konjugation der Peptide und des KLHs wurde in einem Ellmann's Assay ermittelt. In diesem Test reagiert das Ellmann's Reagenz mit freien Sulfhydrylgruppen und bildet ein Chromophor, das bei einer maximalen Absorption bei 412 nm gemessen werden kann.

In 96 well-Mikrotiterplatten wurden je 200 µl Konjugationspuffer mit 10 µl ungekoppeltem und gekoppeltem Peptid versetzt. Als Standard diente hier eine Verdünnungsreihe von L-Cystein (1.5 mg, 1.14 mg, 0.86 mg, 0.64 mg, 0.48 mg, 0.18 mg, 0.09 mg, 0 mg), von der ebenfalls jeweils 10 µl mit 200 µl Konjugationspuffer

versetzt wurden. 20  $\mu$ l Ellmann's Reagenz wurden zugegeben und die freien Sulfhydrylgruppen nach einer 15minütigen Inkubation bei RT bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Standards und Proben wurden in Doppelbestimmungen angesetzt.

#### **2.2.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Die Konzentration von Protein in Lösung wurde mittels des BCA-Protein-Assays Kits (Pierce, USA) nach Vorgaben des Herstellers ermittelt. Gemäß der Biuret-Reaktion wird  $\text{Cu}^{2+}$  durch Protein zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, und dieses  $\text{Cu}^+$  reagiert mit BCA (bicinchoninic acid) zu einem violett gefärbten Produkt. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration gegen eine Standardreihe von BSA ermittelt. Standards und Proben wurden in Dreifachbestimmungen eingesetzt.

## 2.2.4 Immunologische Methoden

### 2.2.4.1 Präabsorption der Seren

Die Humansenen, die für das Immunoscreening genutzt wurden, wurden vor Verwendung mit *E. coli*-Protein präabsorbiert. Auf diese Weise können unspezifische Reaktionen mit dem Protein der Bakterien reduziert werden.

Eine ü/N Kultur von *E. coli* XL1Blue wurde abzentrifugiert und in PBS aufgenommen. Die Bakterien wurden anschließend einer Ultraschallbehandlung von 5 min bei 60 Watt unterzogen und die Zellreste abzentrifugiert. Nitrozellulosemembranen wurden mit dem *E. coli*-Lysat 2 h unter Schwenken inkubiert, so dass die Proteine an die Membran binden konnten, und anschließend drei Mal mit TBS-T gewaschen. Die Seren wurden dann in ihrer endgültigen Verdünnung (1/150 in TBS) jeweils 30 min unter Schwenken bei RT mit vier *E. coli*-Protein-beschichteten Nitrozellulosemembranen inkubiert.

Die Humansenen, die für den ELISA mit dem GST-Fusionsprotein des Klons *Ss-18* verwendet wurden, wurden gegen GST präabsorbiert, um die unspezifische Bindung von Antikörpern mit den Fusionspartner zu verhindern. Zu diesem Zweck wurden die Seren mit 2% aufgereinigtem GST versetzt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Auf gleiche Weise wurden die Schweineseren, die im ELISA verwendet wurden, gegen *E. coli*-Protein präabsorbiert.

### 2.2.4.2 Immunoscreening

Die hier beschriebene Methode basiert auf der spezifischen Bindung eines Antiimmunglobulins mit dem Erst-Antikörper, der gegen ein gesuchtes Protein gerichtet ist. Der Zweit-Antikörper ist mit einer enzymatischen Aktivität gekoppelt, so dass das Farbsignal direkt auf der Nitrozellulose sichtbar wird und eine eindeutige Plaqueidentifizierung möglich wird. Bei der hier verwendeten Enzymaktivität handelte es sich um die Peroxidase aus Meerrettich. Das Enzym setzt sein Substrat, das Hydrogenperoxid, in Wasser um, wenn Elektronendonatoren, wie das Diaminobenzidin oder Tetramethylbenzidin, zur Verfügung stehen. Diese werden in der Reaktion oxidiert und die Oxidationsprodukte polymerisieren zu einem farbigen Produkt.

Für das Immunoscreening wurde zunächst die amplifizierte cDNA-Bank verwendet, bevor auf die nicht amplifizierte übergegangen wurde.

*E. coli* XL1Blue wurden auf LB/Tet ausplattiert und bei 37 ° ü/N inkubiert. Von dieser Platte wurde eine einzelne Kolonie auf einer LB/Tet/MgSO<sub>4</sub> Platte ausgestrichen und angezogen. Beide Platten wurden bei 4 °C gelagert und konnten bis zu zwei Wochen genutzt werden.

15 ml einer *E. coli* XL1Blue ü/N-Kultur in LB/10 mM MgSO<sub>4</sub>/0.2% Maltose, die von der MgSO<sub>4</sub> enthaltenden Platte angeimpft worden war, wurde durch Zentrifugation bei 3000 UpM pelletiert und in 7.5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. 1.2 x 10<sup>4</sup> plaque forming units (pfu) wurden zu 200 µl dieser Lösung pipettiert und mit 100 µl λ-Dilution-Buffer gemischt. Die Phagen konnten 15 min bei 37 °C adsorbieren und wurden anschließend in 5 ml 50 °C warmen Top Agar auf 150 mm LB/MgSO<sub>4</sub>-Platten ausplattiert. Es folgte eine Inkubation bei 40 °C von etwa 3-5 h, bis eine erste Lyse der Bakterien durch die Phagen erkennbar wurde. Nitrozellulose-Membranen (Schleicher & Schuell), die zuvor 20 min in 10 mM IPTG getränkt und leicht abgetupft worden waren, wurden in feuchtem Zustand auf den Bakterienrasen gelegt. Nach einer Inkubation ü/N bei 37 °C wurden die Platten für 30 min bei 4 °C abgekühlt, so dass sich beim Abnehmen der Membranen die Top-Agar Schicht nicht löste. Die Membranen wurden entsprechend der Platten markiert, abgenommen und drei Mal jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation in 5% Magermilchpulver in TBS blockiert. Nach drei weiteren Waschschritten in TBS-T wurden die Membranen für 1.5 h mit einem Sammelserum von zehn Skabies-positiven Patienten (1/150 in TBS) inkubiert. Die Membranen wurden erneut drei Mal gewaschen und anschließend für weitere 1.5 h in dem Peroxidase markierten anti-Human-Antikörper (1/2500 in TBS) geschwenkt. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Reaktionen der exprimierten Klone mit dem Skabies-positiven Serum durch die Zugabe des Substrates (TBS/0.02% Chlornaphthol/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sichtbar gemacht. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Positive Plaques wurden anschließend identifiziert, und nach visuellem Abgleich mit den Membranen wurde der auf der Platte identifizierte Bereich mit einer sterilen 1 ml-Pipettenspitze, deren Spitze abgeschnitten war, ausgestochen. Die Phagen wurden in 500 µl λ-Dilution-Buffer ü/N bei 4 °C aus dem Agar eluiert, das Eluat zur Langzeitlagerung mit 8% DMSO

versetzt und bei - 80 °C gelagert. Der Titer der eluierten Phagen wurde folgendermaßen bestimmt: 1 bzw. 5 µl aus einer 1/100 Verdünnung des Phagenlysats wurden wie oben beschrieben in 3 ml Top Agar auf 90 mm Platten ausplattiert und ü/N bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques ausgezählt und der Titer (y) nach folgender Formel berechnet:

$$(\# \text{ Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \text{ µl/ml}) / \text{µl d. ausplattierten Phagen} = y$$

Zu der Isolierung klonaler Phagen wurden  $3 \times 10^3$  pfu des Eluats unter den oben beschriebenen Bedingungen auf 90 mm Platten in 3 ml Top Agar ausplattiert und der Prozess des Immunscreenings wiederholt, bis klonale Phagen isoliert werden konnten. Die Klonalität der Phagen sowie die Größe der Insertion wurde durch PCR mit phagenspezifischen Primern (s. Punkt 2.2.2.7.5) bestimmt.

#### 2.2.4.3 Detektion *Sarcoptes*-spezifischer Klone im Dot Blot

Die Klone, die im Immunscreening isoliert wurden, sollten auf ihre Spezifität getestet werden. Zu diesem Zweck wurde die Reaktion der Seren von Skabies-positiven bzw. negativen Personen sowie von Hausstaubmilbenallergikern getestet.

*E. coli* XL1Blue ohne den Zusatz von Phagen wurden wie beschrieben ausplattiert. Nach ca. 4 h Inkubation bei 37 °C, nachdem der *E. coli* Rasen sichtbar geworden war, wurden 25 µl des Phagenlysats aufgetragen. Sobald eine Lyse der Bakterien an der betreffenden Stelle detektierbar war, wurde eine in 10 mM IPTG getränkte Nitrozellulosemembran aufgelegt. Der weitere Versuchsablauf verlief wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben.

Ein anderer Versuchsansatz war, die Phagenklone wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben, in 90 mm Petrischalen auszuplattieren. Allerdings wurde die Expression hier durch den Zusatz des IPTGs zu dem Top-Agar, und nicht durch das Auflegen IPTG-beschichteter Nitrozellulosemembranen induziert. Auf Grund des unmittelbaren Kontaktes der Phagen zu dem IPTG enthielt der Top-Agar hier nur 0.5 mM IPTG. Nach einer vollständigen Lyse des *E. coli*-Rasens wurden die Platten mit 0.5 ml 1 x λ-Dilution-Buffer bzw. PBS überschichtet und ü/N bei 4°C inkubiert. 20 µl des Überstandes, in dem sich das rekombinante Antigen befinden sollte, wurden auf eine

Nitrozellulosemembran aufgetragen, diese getrocknet und anschließend im Western Blot entwickelt (s. Punkt 2.2.4.4.1).

#### **2.2.4.4 Western Blot**

##### **2.2.4.4.1 Western Blot mit Humanseren**

Alle Western Blots, die mit Humanseren durchgeführt wurden, wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Nach einem 45 minütigen Semi-Dry Transfers der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran bei 80 mA wurden unspezifische Bindungsstellen 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBS blockiert. Die Membranen wurden 1.5 h mit den Seren in einer Verdünnung von 1/150 in TBS inkubiert. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit TBS-T, bevor die Membranen für weitere 1.5 h mit dem Peroxidase-konjugierten Antikörper inkubiert wurden. Nach drei weiteren Waschschrten (s.o.) erfolgte die Visualisierung der Reaktion durch die Zugabe von TBS/0.02% Chlornaphthol/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alle Reaktionsschritte wurden bei RT durchgeführt.

##### **2.2.4.4.2 Western Blot zur Detektion des Glutathion-S-Transferase-Anhangs**

Das Gen *Ss-18*, das in dem Vektor pET-41a (+) exprimiert wurde, wurde mittels eines anti-GST-Antikörpers im Western Blot detektiert. Nach dem Semi-Dry Transfer (s.o.) wurden unspezifische Bindungsstellen 1 h mit 5% Magermilchpulver in PBS blockiert. Die Inkubationsdauer mit dem anti-GST-Antikörper (Amersham Pharmacia Biotech) in einer Verdünnung 1/1000 in 5% Magermilchpulver/PBS betrug 1 h. Nach dreimaligem Waschen von jeweils 5 min mit PBS/0.3% Tween folgte eine einstündige Inkubation mit dem mit Alkalischer Phosphatase-konjugiertem Antikörper (1/5000 in PBS/5% Magermilchpulver). Die Membran wurde erneut drei Mal gewaschen (s.o.) und kurz mit AP-Puffer gespült. Abschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe der Substrate BCIP (0.017%) und NBT (0.033%) in AP-Puffer farblich sichtbar gemacht. Alle Reaktionsschritte wurden bei RT durchgeführt.

##### **2.2.4.4.3 Western Blot zur Detektion des Histidin-Anhangs**

Die in dem Vektor pQE-30, -31 und -32 (QIAGEN) exprimierten Gene bzw. Genfragmente wurden mittels eines anti-His-Antikörpers im Western Blot detektiert.



Nach dem Semi-Dry Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran (s.o.) wurden unspezifische Bindungsstellen 30 min mit TBS/2% BSA blockiert. Es folgte eine 1.5stündige Inkubation mit dem anti-His-Antikörper (1/2500 in TBS/2% BSA) gefolgt von einem dreimaligen Waschen von jeweils 5 min mit TBS/0.2% Triton. Anschließend wurden die Membranen für 1.5 h in dem mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörper (anti-His 1/5000 in TBS/2% BSA) geschwenkt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBS und ein kurzes Abspülen der Membran mit AP-Puffer. Die Reaktion wurde durch die Inkubation mit 0.017% BCIP und 0.033% NBT in AP-Puffer sichtbar gemacht. Alle Reaktionsschritte wurden bei RT durchgeführt.

#### **2.2.4.4 Western Blot mit BALB/c-Seren**

Für die Detektion der repetitiven Proteine im Gesamtantigen von *S. scabiei* wurden die Seren der BALB/c-Mäuse, die gegen das Peptid A2-KLH und gegen das Fusionsprotein *Ss-18/GST* immunisiert worden waren, genutzt. Auch die erfolgreiche Immunisierung der Mäuse wurde im Western Blot unter Verwendung des rekombinanten Proteins von Klon *Ss-14*, exprimiert in TriplEx2, überprüft.

Es wurden ca. 50 µg des Überstandes von dem Antigenextrakt und nach Auftrennung der Proteine diese in einem Semi-Dry Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Es folgte eine 30minütige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch die Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit dem BALB/c-Serum (1/100 in TBS der  $\alpha$ -Peptidseren, 1/150 der  $\alpha$ -*Ss18/GST*-Seren) 1.5 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte, bevor der AP-konjugierte Antikörper (1/2500 in 5% Magermilchpulver/TBS) für 1.5 h auf die Membranen pipettiert wurde. Nach erneutem dreimaligen Waschen und Spülen mit AP-Puffer wurde die Reaktion mit 0.017% BCIP und 0.033% NBT in AP-Puffer sichtbar gemacht. Alle Reaktionsschritte wurden bei RT durchgeführt.

#### **2.2.4.5 Dialyse von harnstoffhaltigen Proteinlösungen**

Die Proteine, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden mussten, wurden gegen Harnstoff-niedermolare Puffer dialysiert, um sie im ELISA verwenden zu können.

Zu diesem Zweck wurden 0.5-1 ml des jeweiligen Proteineluats in Dialyseschläuche, die 5 min in dest. H<sub>2</sub>O gekocht worden waren, pipettiert und die Schläuche mit den dazugehörigen Klemmen verschlossen. In dem zehnfachen Volumen eines 4 M Harnstoffpuffers erfolgte unter ständigem Rühren bei 4 °C ü/N die Dialyse. Am nächsten Morgen wurde der 4 M Harnstoffpuffer durch einen 3 M Harnstoffpuffer ersetzt. Die weitere Dialyse erfolgte jeweils in zweistündigen Inkubationsschritten über einen 2 M- und einen 1 M Harnstoffpuffer bis hin zu PBS. Die Proteine wurden dann bei - 20 °C gelagert. Im ELISA konnten die Proteine in 2 M Harnstoffpuffer eingesetzt werden.

#### **2.2.4.6 ELISA**

##### **2.2.4.6.1 Sarcptes-ELISA 2001®**

Die Schweineseren mussten vor Verwendung im ELISA mit den rekombinanten Antigenen auf ihre Reaktivität mit Gesamtantigen von *S. scabiei* getestet werden.

Der Sarcptes-ELISA 2001® (Afosa GmbH) wurde zu diesem Zweck nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Seren, die eine eindeutig positive Reaktion, die hier in Form eines Index angegeben wird, zeigten, wurden in dem ELISA mit den rekombinanten Antigenen verwendet.

##### **2.2.4.6.2 ELISA mit rekombinanten Antigenen und Gesamtantigen**

Die rekombinanten Antigene wurden im ELISA auf ihre potenzielle Eignung für die Serodiagnostik untersucht. Zu diesem Zweck wurden 100 ng des zu untersuchenden Antigens in 50 µl Beschichtungspuffer in 96-Loch-Platten (Nunc) pipettiert und für die Bindung an die Platte ü/N bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten drei Mal mit jeweils 300 µl PBS/0.025% Tween pro Loch gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen 45 min mit 3% BSA in PBS in einem Volumen von 100 µl pro Loch blockiert. Nach drei weiteren Waschschritten (s.o.) folgte eine Inkubation von 1 h mit 50 µl des entsprechenden Serums (Schweine- und Humanseren) in verschiedenen Verdünnungsstufen in PBS/3% BSA (s. Punkt 3.10). Es wurde erneut drei Mal gewaschen (s.o.) und dann 1 h mit 50 µl des mit Peroxidase-konjugierten Antikörpers in einer Verdünnung von 1/10.000 in PBS/3% BSA inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden bei 37 °C durchgeführt. Nach drei weiteren Waschschritten wurde die Substratlösung in einem Volumen von 50 µl pro

Loch pipettiert. Nach ca. 3-5 min wurde die Reaktion mit dem gleichen Volumen von 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt und die Extinktion photometrisch bei 450/630 nm bestimmt. Die Mittelwerte von zwei Parallelansätzen wurden ermittelt.

#### **2.2.4.6.3 ELISA mit synthetischen Peptiden**

Die Immunreaktion der gegen die synthetischen Peptide immunisierten BALB/c-Mäuse wurde ebenfalls im ELISA gemessen. Die Testdurchführung erfolgte wie unter Punkt 2.2.4.6.2 beschrieben, mit der Ausnahme, dass die BALB/c-Seren in einer Verdünnung von 1/200 eingesetzt wurden. Bei dem verwendeten zweiten Antikörper handelte es sich um ein AP-Konjugat, so dass die Phosphatase-Substratlösung in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  pro Loch eingesetzt wurde, mit der 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe des halben Volumens von 0.1 M EDTA abgestoppt. Die OD wurde photometrisch bei 405/630 nm gemessen und der Mittelwert von zwei Parallelansätzen ermittelt.

#### **2.2.4.7 Deglykosilierung von SsGesamtantigen**

Das Gesamtantigen von *Sarcoptes* wurde deglykosiliert, um festzustellen, ob bei einer Infektion eine Immunreaktion des Wirtes gegen das reine Protein vorliegt, oder ob diese gegen glykosiliertes Protein gerichtet ist.

Die Perjodatoxidation öffnet, durch die Spaltung zwischen angrenzenden Zuckern, die Hydroxylgruppen enthalten, Zuckerringe und zerstört so die Integrität der Kohlenhydratstruktur. Zu diesem Zweck wurden ELISA-Platten mit 100 ng Gesamtantigen beschichtet (s. Punkt 2.2.4.6.2). Es wurde drei Mal mit PBS/0.025% Tween gewaschen und anschließend mit 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 4.5 gespült. Die Deglykosilierung erfolgte durch eine Inkubation von 1 h unter Lichtausschluss mit 30 mM  $\text{NaIO}_4$  in Na-Acetat-Puffer. Die Platten wurden erneut mit Na-Acetat-Puffer ausgespült, bevor das Antigen 30 min mit 50 mM Na-Borhydrid inkubiert wurde. Als Negativkontrolle wurde das Antigen wie oben beschrieben behandelt, mit der Ausnahme, dass nicht  $\text{NaIO}_4$ , sondern nur Na-Acetat-Puffer eingesetzt wurde. Das Gesamtantigen der dritten Larven von *Acanthocheilonema viteae* diente als Positivkontrolle. Ein monoklonaler Antikörper (24-4 Antikörper, Adam et al. 1996), der im folgenden ELISA verwendet wurde, reagiert ausschließlich mit der nativen

Chitinase, d.h. dem glykosilierten Protein dieser Larven. Der ELISA wurde, wie unter Punkt 2.2.4.6.2 beschrieben, durchgeführt.

#### **2.2.4.8 Immunisierung von BALB/c-Mäusen**

Das Serum von BALB/c-Mäusen, immunisiert mit Peptiden, deren Sequenz aus den „KE-reichen Antigenen“ abgeleitet worden war, sollte für Lokalisierungsstudien dieser Proteine in der Milbe verwendet werden.

Für die Immunisierung der Mäuse wurde das Adjuvans STP, welches sowohl die zellvermittelte als auch die humorale Immunantwort anregt, verwendet. Jeweils drei BALB/c-Mäuse (männlich oder weiblich), die zwischen 8-10 Wochen alt waren, wurden an Tag 0 mit 100 µg an KLH gekoppeltem Peptid, das im gleichen Volumen wie das Adjuvans eingesetzt wurde, immunisiert. Die Lösung wurde sowohl intraperitoneal als auch subkutan in die Halsfalte appliziert. Am Tag 14 wurde eine erneute Immunisierung vorgenommen und am Tag 21 das Testblut auf eine Antikörperantwort im ELISA gemessen. Es folgten eine weitere Immunisierung am Tag 28 und die Messung der Antikörperantwort am Tag 35. Am Tag 38 wurden die Tiere getötet und das gewonnene Serum konnte in der Immunhistochemie sowie im Western Blot eingesetzt werden. Die Immunisierung der BALB/c-Mäuse mit dem Protein des Klons *Ss18/GST* sowie mit reinem GST erfolgte auf die gleiche Weise. Das  $\alpha$ -*Ss18/GST*-Serum sollte dem Nachweis der in den *Sarcoptes*-Milben exprimierten Proteine dienen.

#### **2.2.4.9 Immunhistochemie**

Für eine Detektion von Proteinen im Gewebe ist es wichtig, dass das zu untersuchende Material in frischem Zustand eingefroren wird, um eine Proteolyse zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden lebendige *S. scabiei* var. *bovis*-Milben in kleinen Einbettungsschalen (Miles Inc.) in Tissue Tek® (Zakura) aufgenommen und sofort bei - 80 °C eingefroren. Im Cryocut (Leica) wurden von diesen Blöcken 9 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser) überführt wurden. Diese Objektträger wurden dann bis zu weiteren Verarbeitung der Schnitte ebenfalls bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.4.9.1 Detektion durch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierte Antikörper**

Die Fixier-, Wasch- und Blockierungsschritte wurden in Färbeküvetten durchgeführt, während die Antikörper direkt auf die Objektträger pipettiert wurden.

Für die Fixierung und Freilegung der Epitope wurden die Schnitte 10 min in 2.5% Paraformaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Einbettungsmedium durch eine 20minütige Inkubation in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 vom Objektträger gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden 45 min in PBS/10% FCS blockiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS/0.05% Tween wurde das Serum der immunisierten BALB/c-Mäuse in einer Verdünnung 1/20 in 2% FCS in einem Volumen von etwa 600 µl auf die Objektträger pipettiert. Der 60minütigen Inkubation mit dem ersten Antikörper folgten drei weitere Waschschrte und eine Inkubation von einer Stunde mit dem FITC-markierten Maus-Konjugat (1/100 in 2% FCS). Nach dreimaligem Waschen wurden die Schnitte mit Mowiol (Sigma) bedeckt und eingedeckelt. Die markierten Schnitte können bei 4 °C im Dunkeln für mehrere Monate gelagert werden, ohne dass die mikroskopische Detektion des FITC-markierten Antikörpers beeinträchtigt wird.

#### **2.2.4.9.2 Detektion durch Peroxidase-markierte Antikörper**

Wie unter Punkt 2.2.4.9.1 beschrieben wurden auch hier die Fixier-, Wasch- und Blockierungsschritte in Färbeküvetten durchgeführt, wohingegen die Antikörper direkt auf die Objektträger pipettiert wurden.

Die Fixierung und Freilegung erfolgte ebenfalls durch eine Inkubation der *Sarcoptes*-Gefrierschnitte in 2.5% Paraformaldehyd. Das Einbettungsmedium wurde durch eine Inkubation von 10 min in PBS entfernt. Anschließend folgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch eine 30minütige Inkubation in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol. Durch diese Inaktivierung werden unspezifische Reaktionen der endogenen Peroxidase und damit Hintergrundreaktionen unterdrückt. Es folgten drei Waschschrte von jeweils 10 min mit PBS und anschließend eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen von 30 min in PBS/10% FCS. Nach Waschen von 10 min mit PBS wurden die Gefrierschnitte dann mit dem BALB/c-anti-Peptid A2 - Serum (1/20 in PBS/2% FCS) 2 h bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS von jeweils 10 min entfernt. Es folgte eine 30minütige Inkubation mit dem Peroxidase konjugierten Ziege-anti-Maus Antikörper

(1/100 in PBS/2% FCS), bevor erneut 10 min mit PBS gewaschen wurde. Die Schnitte wurden dann 5-10 min mit der Substratlösung inkubiert, bis eine deutliche Braunfärbung zu erkennen war. Nach weiterem Waschen in PBS wurde eine Haematoxylin-Eosin-Gegenfärbung durchgeführt.

#### **2.2.4.9.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung wurde durchgeführt, um innere Strukturen näher determinieren zu können. Der Farbstoff Hämalan ist positiv geladen und bindet an die sauren Bestandteile der DNA, so dass Zellkerne blau angefärbt werden. Eosin hingegen ist negativ geladen und bindet an positiv geladene Gewebebestandteile wie Eiweiße, so dass das Plasma rot angefärbt wird.

Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden kurz mit dest. H<sub>2</sub>O abgespült und dann 3 min in Hämalan inkubiert. Nach einem 5minütigen Waschen mit Leitungswasser wurden die Objektträger ein weiteres Mal mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgten 5 min Inkubation in Eosin und ein erneutes Abspülen in dest. H<sub>2</sub>O, bevor die Gefrierschnitte unter Verwendung von Mowiol (Sigma) eingedeckelt wurden.

#### **2.2.4.9.4 Methylenblau Färbung**

Semidünnschnitte (1 µm) der *Sarcoptes*-Milben wurden 5 min in Methylenblau gefärbt (Böck 1989).

#### **2.2.4.9.5 Elektronenmikroskopie**

Für eine effektive Fixierung der *Sarcoptes*-Milben wurde diesen vorher der Kopf mittels einer Skalpellklinge abgetrennt, so dass das Medium in den Milbenkörper eindringen konnte. Darauf folgten eine 24stündige Fixierung in Fixierlösung I bei 4 °C und ein Waschen ü/N in Waschpuffer I. Die Milben wurden dann 5 h bei 4 °C in Lösung II nachfixiert, bevor sie jeweils mit den Waschpuffern I und II gewaschen wurden. Es folgte eine Inkubation der Milben für 1 h in der Färbelösung inkubiert. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96% jeweils 20 min und 3 x 100% jeweils 45 min) erfolgte die Dehydrierung der Milben und eine anschließende Einbettung in Spurr's Epoxy-Medium. Nachdem die Schnitte angefertigt worden waren, wurden diese mit Uranyl-Acetat und Reynold'scher Lösung nachfixiert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Elektronenmikroskopie

unter Leitung von PD Dr. W. Bleiß (Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie) durchgeführt.

### **2.2.5 Statistische Analyse**

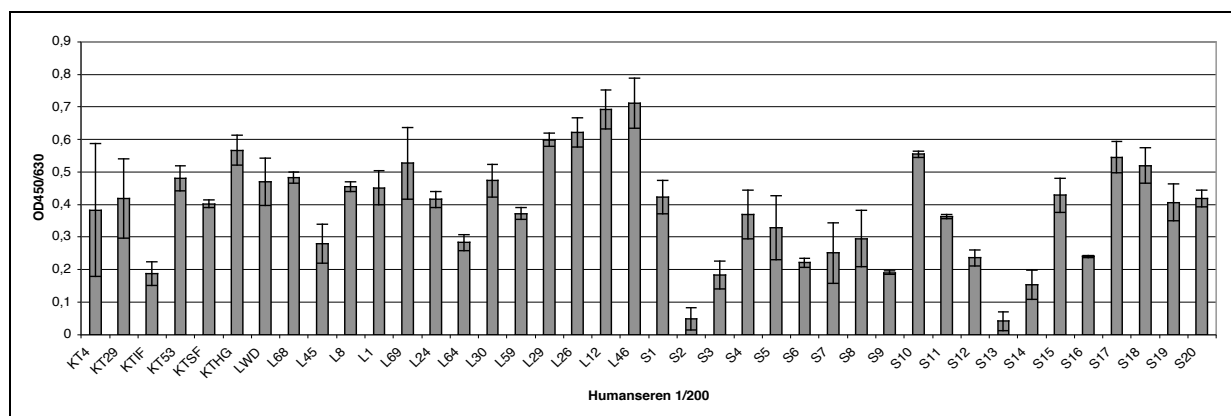
Die Ergebnisse aus den ELISAs wurden auf signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Positiv- und der Negativseren hin überprüft. Zu diesem Zweck wurden der t-test bzw. der Mann-Whitney Rank Sum Test unter Verwendung des Computerprogramms SigmaStat 2.0 (Jandel) eingesetzt.

Eine potenzielle Korrelation der Ergebnisse aus den ELISAs, in denen die rekombinanten Antigene getestet wurden, zu denen aus dem ELISA mit Gesamtantigen wurde nach SPEARMAN berechnet (SigmaStat 2.0, Jandel).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reaktion der humanen Patientenseren mit *Ss*Gesamtantigen im ELISA

Die IgG- und IgM-Titer der Skabies-positiven Humansenen waren, bevor sie für diese Arbeit bereitgestellt wurden, von der Afosa GmbH ermittelt worden. Trotzdem wurden die Seren, wie auch die Negativseren, erneut im ELISA mit Gesamtantigen von *S. scabiei* var. *suis* getestet. Diese ELISAs wurden unter den Bedingungen wie auch alle folgenden ELISAs unter Verwendung der rekombinanten Antigene durchgeführt, so dass ein direkter Vergleich möglich war. Die Ergebnisse dieser ELISAs korrelieren nicht mit den von der Afosa GmbH ermittelten Titern ( $p > 0.05$ ) (s. Punkt 2.1.8). Vermutlich ist dies auf die unterschiedlichen Bedingungen in der Versuchsdurchführung zurückzuführen. Des Weiteren wurden die Ergebnisse nicht um einen Kontrollwert korrigiert, wie es bei der Afosa GmbH der Fall war. Aus Abb. 2 ist deutlich ersichtlich, dass die Negativseren einen hohen Hintergrund aufwiesen, während einige Positiv-Seren keine eindeutig positive Reaktion zeigen. Der Mittelwert der Positivseren beträgt  $OD_{450/630}$  0.464 ( $\pm 0.133$ ), während sich der der Negativseren auf  $OD_{450/630}$  0.311 ( $\pm 0.151$ ) beläuft. Es bestanden signifikante Differenzen zwischen den Ergebnissen der Positiv- und denen der Negativseren ( $p = 0.002$ ). Eine verlässliche Serodiagnostik mit Gesamtantigen ist allerdings auf Grund der hohen Werte der meisten Negativseren unter diesen Umständen nicht möglich.

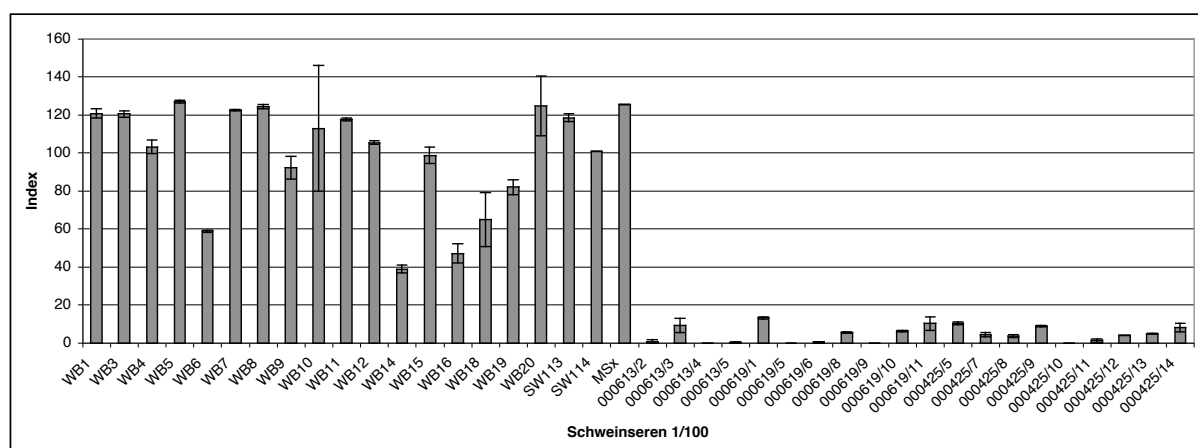


**Abb. 2: ELISA mit Gesamtantigen von *S. scabiei* var. *suis* unter Verwendung von Skabies-positiven und -negativen Patientenseren.** Bei den Seren KT4 bis L46 handelt es sich um Seren von erkrankten Patienten, während die Seren S1 bis S20 von gesunden Kontrollpersonen stammen.



### 3.2 Reaktion der Schweineseren mit SsGesamtantigenen im ELISA

Die IgG-Titer der Schweineseren, die auf ihre Reaktion mit den rekombinanten Antigenen getestet werden sollten, wurden vorab im *Sarcoptes*-ELISA 2001® ermittelt. Die Tiere, von denen die Seren stammten, waren vorher als eindeutig Räude-positiv identifiziert worden. Das bedeutet, dass hier keine Seren von fraglich Räude-positiven Tieren eingesetzt wurden, bei denen eine Diagnose mit SsGesamtantigenen bekanntlich schwierig sein kann. Die Grenzwerte liegen in diesem Test bei < 16 für eine Räude-negative Diagnose, 16-24 für eine fragliche und > 24 für eine Räude-positive Diagnose. Die Titer wurden in Form von Indizes, wie vom Hersteller vorgegeben, angegeben (s. Abb. 3). Die in Abb. 3 dargestellten Seren wurden, auf Grund der eindeutigen Diagnose eines Rädemilben-Befalls bzw. der Räudefreiheit, in den nachfolgenden ELISAs mit rekombinantem Antigen verwendet.



**Abb. 3: Index der im ELISA mit rekombinanten Antigenen verwendeten Schweineseren.** Die Seren WB1 bis WB23 stammen von Räude positiven-Schweinen, während die Seren 000613/2 bis einschließlich 000425/14 Seren von Räude-negativen Schweinen sind.

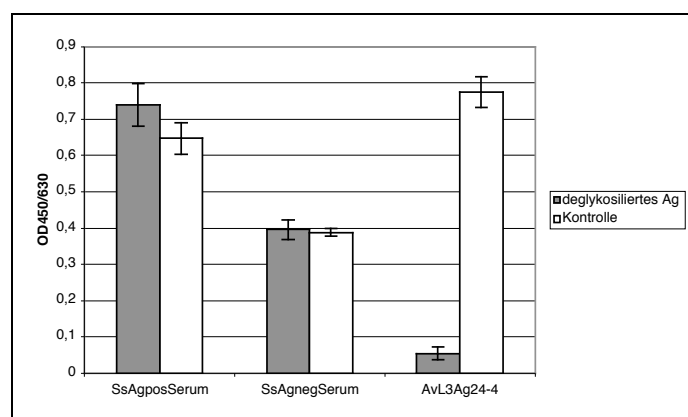
### 3.3 Reaktion der humanen Patientenseren mit SsGesamtantigenen im Western Blot

Im Vorfeld wurde ein Western Blot unter Verwendung von Gesamtantigenen der *Sarcoptes*-Milben und der Skabies-positiven und -negativen Seren sowie derer von Hausstaubmilbenallergikern durchgeführt. Dieser Versuch diente der Detektion von *Sarcoptes*-spezifischen Banden, um eine Vorstellung von der Größe der gesuchten

Proteine zu erhalten. Es konnten allerdings keine prominenten Banden ermittelt werden, die von den meisten Seren Skabies-positiver Patienten, nicht aber von den negativen, erkannt wurden.

### 3.4 Antikörperantwort der Patienten gegen deglykosiliertes SsGesamtantigen

Vor der Konstruktion einer Expressions-Genbank sollte ermittelt werden, ob sich ein prokaryotisches System, in dem posttranslationale Modifikationen unterbleiben, für die Expression immunreaktiver Antigene von *S. scabiei* eignete. Zu diesem Zweck wurde das Gesamtantigen deglykosiliert, und unter Verwendung dieses behandelten Antigens wurden die IgG-Reaktionen Skabies-positiver Patientenseren im ELISA getestet. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, ob die Antikörperantwort der Patienten gegen Zuckergruppen der Proteine gerichtet ist. Hier kamen die Humansenen L26, L12 und L48 zum Einsatz, die im ELISA mit Gesamtantigen eine hohe Reaktion gezeigt hatten. Der ELISA mit dem deglykosilierten Gesamtantigen ergab, dass die Antikörperantwort der Skabies-Patienten überwiegend gegen die Polypeptidkette des Milbenproteins gerichtet und unabhängig von der Glykosylierung der Proteine ist (s. Abb. 4). Der 24-4 Antikörper wurde hier als Positivkontrolle eingesetzt da er nur mit der glykosylierten Chitinase dritter Larven (L3) von *A. viteae* reagiert. Unter Verwendung dieses Antikörpers war keine Reaktion mit dem deglykosilierten Gesamtantigen der L3 von *A. viteae* detektierbar.

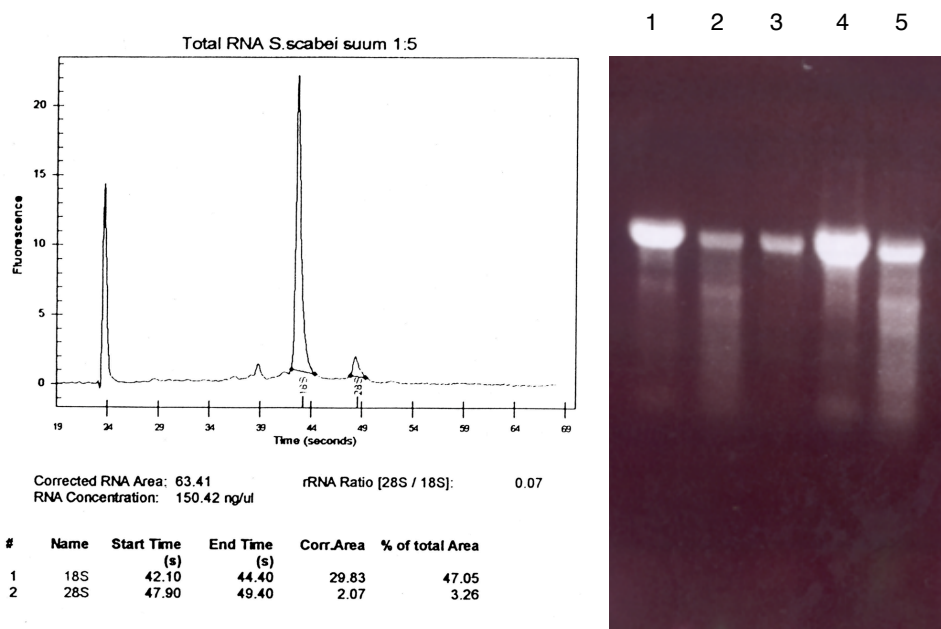


**Abb. 4: ELISA mit deglykosiliertem und glykosiliertem Gesamtantigen von *S. scabiei* var. *suis*.** Nach Deglykosylierung des Antigens wurde ein ELISA unter Verwendung von Skabies-positivem und -negativem Serum durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der 24-4 Antikörper, der nur mit der glykosylierten Chitinase der dritten Larven (L3) von *A. viteae*, nicht aber mit der deglykosilierten reagiert.

### 3.5 Isolierung der Gesamt-RNA aus *Sarcoptes scabiei*

Aus etwa 20 mg kryozertrümmerten Milben konnten in einem ersten Extraktionsschritt (in 30 µl RNase freiem dest. H<sub>2</sub>O) bis zu 46 µg Gesamt-RNA isoliert werden. Die Darstellung der 18 S und der 28 S RNA im Bioanalyzer ergab, dass die RNA keiner sichtbaren Degradierung unterlegen war (s. Abb. 5). Auch die Analyse auf dem Formaldehyd-Agarosegel zeigt nur eine geringe Degradierung der RNA, die wahrscheinlich auf den Lauf der RNA im Gel zurückzuführen ist.

Die in Abb. 5 dargestellte Gesamt-RNA wurde für die Erstellung der cDNA-Phagen-Bank eingesetzt.



**Abb. 5:** Darstellung der Gesamt-RNA von *S. scabiei* im Bioanalyzer (links) und im Ethidiumbromid gefärbten Formaldehyd-Agarosegel (rechts). Die links dargestellte RNA setzt sich aus den im Gel (rechts) aufgetrennten Isolaten (Spur 1-5) zusammen.

### 3.6 cDNA-Phagen-Bank in λTriplEx2

Die cDNA-Bank von *S. scabiei* var. *suus* wurde in dem Phagen λTriplEx2 von der Firma CLONTECH (Heidelberg) synthetisiert. Der Titer der nicht amplifizierten Bank betrug  $4.0 \times 10^6$  pfu/ml, während sich der der von der Firma amplifizierten Bank auf  $> 10^9$  pfu/ml belief. 85% der Klone in der cDNA-Bank waren rekombinant und diese

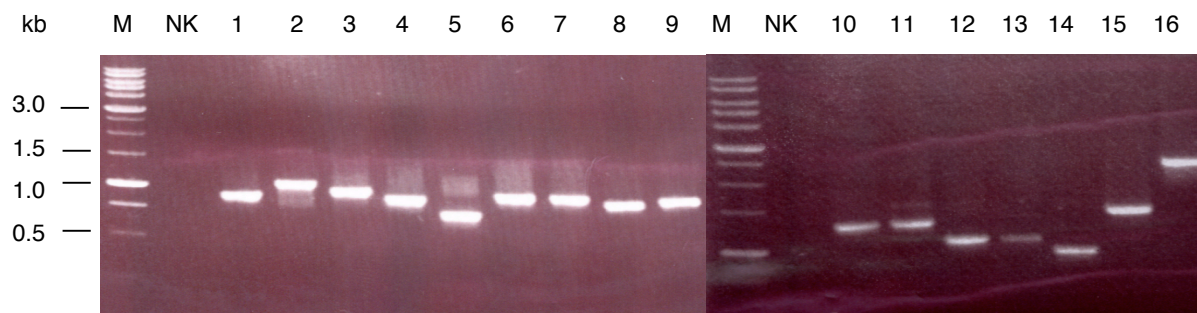
enthielt  $2.4 \times 10^6$  unabhängige Klone. Die durchschnittliche Größe der Insertionen belief sich auf 1.3 kb, wobei sich diese Größen in der Ordnung zwischen 0.5 und 3.0 kb bewegten.

### 3.7 Immunoscreening

Für die Charakterisierung immunreaktiver Antigene von *S. scabiei* wurden  $3.5 \times 10^5$  rekombinante Phagen auf ihre Reaktion mit dem Serum von zehn Skabies-positiven Patienten überprüft. 61 Phagenklone, die mit dem Serum reagierten, wurden in mehreren Klonierungsschritten isoliert und aus dem Phagen exzisiert.

#### 3.7.1 Insertionsgrößen der isolierten immunreaktiven Klone

Nach der *in vivo*-Exzision der Plasmide wurden die Größen der Insertionen mittels einer PCR mit plasmidspezifischen Primern ermittelt. Gleichzeitig diente diese PCR der Überprüfung der Klonalität des isolierten Phagen. Die Größe der Insertionen der Klone betrug zwischen ca. 560 und 2460 bp (s. Abb. 6).



**Abb. 6: Beispielhafte Darstellung der Insertionsgrößen von isolierten immunreaktiven Klonen.** Die Insertionen wurden mittels einer PCR mit phagenpezifischen Primern amplifiziert. Eine einzelne Bande wurde als Indiz für die Klonalität des jeweiligen isolierten Phagenklons gewertet.

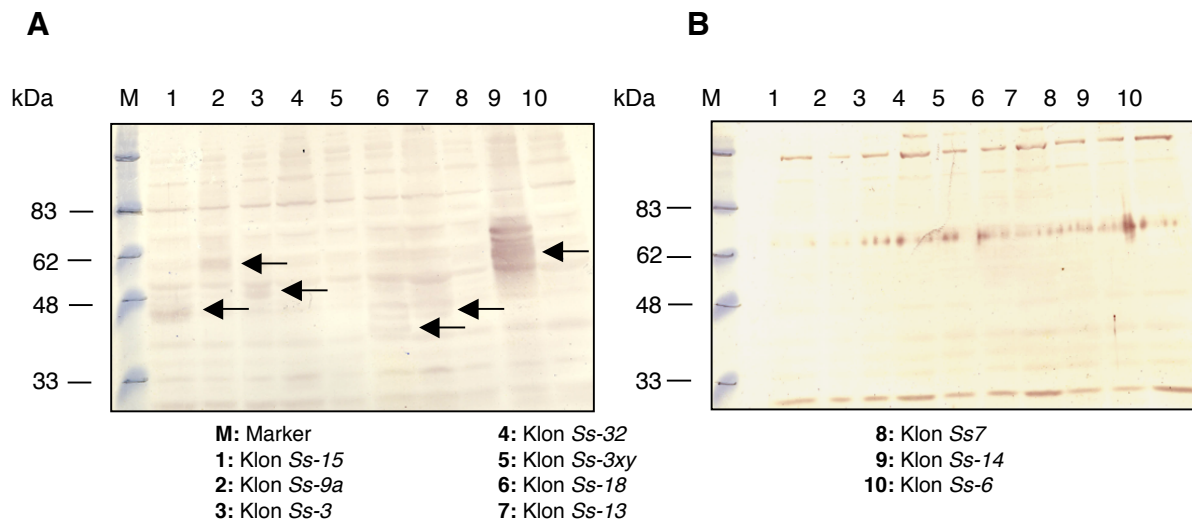
### 3.8 Auswahl von *Sarcoptes*-spezifischen Klonen

Nach der Isolierung der 61 immunreaktiven Klone sollten diese auf ihre Spezifität getestet werden. Zunächst war geplant, diese Spezifität durch ein relativ einfaches und zeitsparendes Verfahren, bei dem alle Klone parallel untersucht werden können,

zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden die Lysate der induzierten rekombinanten Phagen direkt auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert. Anschließend wurden die Antigene im Western Blot auf ihre spezifische Reaktivität mit dem Serum Skabies-positiver Patienten im Vergleich zu dem von drei negativen Kontrollpersonen sowie dem von sieben Hausstaubmilbenallergikern getestet. Die unspezifische Hintergrundsreaktion mit *E. coli*-Protein, das in dem Phagenlysat vorhanden war, war trotz der Präabsorption der Seren mit *E. coli*-Lysat so dominant, dass keine spezifische Reaktivität des positiven Serums ermittelt werden konnte. Das gleiche Ergebnis erbrachte der Versuchsansatz, die Lysate der Phagenklone auf einen *E. coli*-Rasen aufzutropfen, die Gene mittels einer IPTG-getränkten Nitrozellulosemembran zur Expression zu bringen, und die Reaktivität der Seren mit den auf die Membran transferierten Proteinen im Western Blot zu testen.

Aus diesem Grund wurden die Plasmide aus den Phagen exzisiert und für eine Expression der Gene aus *E. coli* BM25.8 in *E. coli* XL1Blue transformiert. Nach einer Induktion aller Klone mit 1 mM IPTG wurde das im SDS-Gel aufgetrennte Protein im Western Blot auf eine spezifische Reaktion mit den jeweiligen Seren getestet. Auf Grund der Bandenaufftrennung konnte eine Reaktion des Serums spezifischen Banden, die nach Induktion zusätzlich auftraten wurden, zugeordnet werden. Hier wurden nur die Seren Skabies-positiver und -negativer Patienten verwendet, da zunächst lediglich eine grobe Auswahl der Klone getroffen werden sollte (s. Abb. 7).

Anhand dieses Versuchsansatzes wurden sieben Klone identifiziert, die im Western Blot ausschließlich eine Reaktion mit dem Serum der Skabies-Patienten zeigten. Die anschließende Sequenzierung zeigte, dass es sich hierbei, abgesehen von einem Klon (Ss-37), ausschließlich um homologe Klone handelte, die sich durch eine hochrepetitive zentrale Region auszeichneten. Dieser Bereich setzt sich hauptsächlich aus den Nukleotiden Adenin (A) und Guanin (G) (GA-repetitiv genannt) zusammen, deren offener Leserahmen (ORF) überwiegend für die Aminosäuren Glutamat (E) und Lysin (K) kodiert. Die Proteine dieser Klone werden im Folgenden „KE-reiche Antigene“ genannt.



**Abb. 7: Darstellung von sechs der sieben im Western Blot identifizierten *Sarcoptes*-spezifischen immunreaktiven Klone.** Die spezifischen Banden, die eine Reaktivität mit dem Serum aufwiesen, sind markiert (A: Skabies-positives Sammelserum). Eine Reaktion mit dem Sammelserum gesunder Personen (B) ist im Western Blot (rechts) nicht detektierbar. Für alle hier markierten Klone ergab die Sequenzierung eine homologe Sequenz, die sich durch eine hochrepetitive Zentralregion auszeichnet. Ein weiterer Klon (Ss-37), der im Western Blot nur mit dem positiven Serum reagierte, ist hier nicht dargestellt.

Auf Grund der hohen Frequenz dieser für „KE-reiche Antigene“-kodierenden Sequenzen, wurde eine DNA-Hybridisierung (s. Punkt 3.9.2.4.1) mit allen bis zu diesem Zeitpunkt unbekannten Klonen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Sonde aus konservierten Bereichen der hier identifizierten Sequenzen verwendet. Es wurden 20 weitere Klone identifiziert, die ebenfalls Sequenzen enthielten, die für „KE-reiche Antigene“ kodieren.

Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen wurden nicht alle Gene exprimiert, und so wurden anschließend zehn weitere Klone, für die die DNA-Hybridisierung keine Sequenz ergeben hatte, die für „KE-reiche Antigene“ kodiert, ausgewählt. Diese Klone hatten im Immunoscreening eine deutliche, positive Reaktion gezeigt. Die Klone wurden sequenziert, in Expressionsvektoren kloniert und erst nach Aufreinigung der Proteine auf ihre Skabies-Spezifität getestet. Die durch Sequenzierung oder DNA-Hybridisierung identifizierten Klone sind in Tab. 3 dargestellt.

**Tab. 3: Darstellung der Homologien der bekannten, im Immunscreening identifizierten Klone.**  
 Von den hier gezeigten Klonen wurden die Sequenzen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 8 sowie einer der unter Sequenz 11 zusammengefassten Klone erfolgreich exprimiert und das rekombinante Protein aufgereinigt.

Sequenz	Anzahl der Klone	%	durch BLASTX-Analyse ermittelte Homologien	E-Wert	Treffer in der EST-Datenbank von <i>S. scabiei</i>
1	1	1.6	Dehydrogenase/Reduktase ( <i>A. aegypti</i> )	6e <sup>-37</sup>	0
2	1	1.6	Titin ( <i>D. melanogaster</i> )	5e <sup>-14</sup>	1
3	2	3.2	keine Homologie	-	1
4	2	3.2	Tyrosin-spez. Protein einer Phosphatase-Familie ( <i>C. elegans</i> )	e <sup>-19</sup>	0
5	1	1.6	SMIPP-S ( <i>S. scabiei</i> )	8e <sup>-92</sup>	0
6	3	4.9	ovarielle, Fibroin-ähnliche Substanz-2 ( <i>C. carpio</i> )	2e <sup>-64</sup>	17
7	1	1.6	keine Homologie	-	0
8	1	1.6	ovarielle, Fibroin-ähnliche Substanz-4 ( <i>C. carpio</i> )	1e <sup>-45</sup>	4
9	1	1.6	Kettin ( <i>D. melanogaster</i> )	2e <sup>-09</sup>	0
10	1	1.6	keine Homologie	-	0
11	26	42.6	hypothetisches Protein ( <i>P. falciparum</i> )	2e <sup>-47</sup>	0
<b>Summe:</b>	<b>40</b>				

Der Abgleich der Sequenzen mit den Daten aus der öffentlichen Datenbank (Genbank) ergab, dass keine kontaminierenden Sequenzen vom Schwein isoliert worden waren.

### 3.9 Charakterisierung, Expression und Aufreinigung der immunreaktiven Antigene

Die Sequenzen aller sequenzierten Klone wurden durch eine BLAST-Analyse mit bekannten, öffentlich zugänglichen Nukleotid- und Proteinsequenzen verglichen (Genbank). Unter Verwendung der BLASTN-Analyse wurden Homologien zwischen den Nukleotidsequenzen ermittelt, während Proteinsequenzen durch den Gebrauch der BLASTP-Analyse untereinander abgeglichen wurden. In der BLASTX-Analyse hingegen wurden sowohl die hier ermittelten Nukleotidsequenzen als auch die in der öffentlichen Datenbank in allen drei Leserahmen übersetzt und zwischen diesen Aminosäuresequenzen Homologien ermittelt. Diverse Antigene wurden identifiziert, die repetitive Domänen enthalten. Nach diesem Kriterium sind die Antigene in der folgenden Charakterisierung gruppiert. Alle Positionsangaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die vollständigen Sequenzen in dem Plasmid pTriplEx2.

Die Expression der rekombinanten Antigene wurde mittels des Western Blots mit anti-His- bzw. anti-GST-Antikörpern (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen.

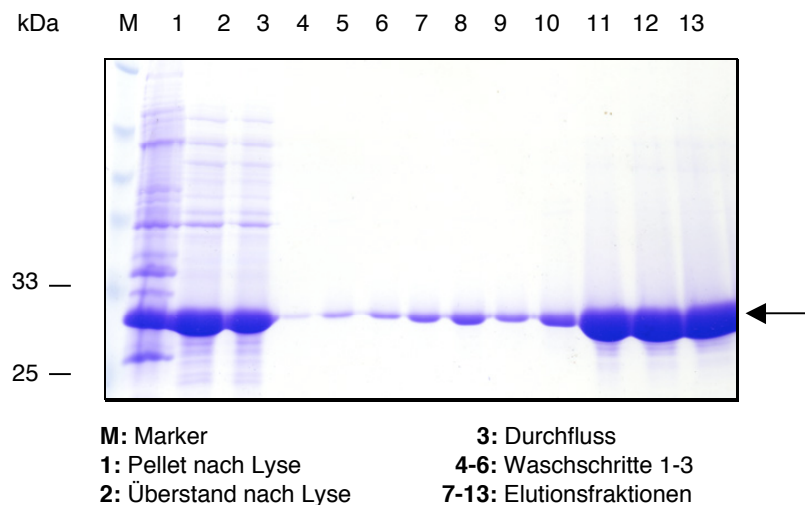
### 3.9.1 Antigene ohne repetitive Domänen

#### 3.9.1.1 Klon Ss-4

Die BLASTX-Analyse ergab für den Klon Ss-4 Homologien (E-Wert  $6e^{-37}$ ) zu einer Dehydrogenase/Reduktase von *Aedes aegypti* (Acc. No.: AY064123.1). An Position 105 befindet sich das Start- und an Stelle 915 ein Stop-Codon. Die Strukturanalyse zeigte kaum potenzielle Epitope. Eine Anhäufung von Aminosäuren, deren Struktur auf eine Immunogenität hinweisen könnte, tritt nicht auf (s. Abb. 9).

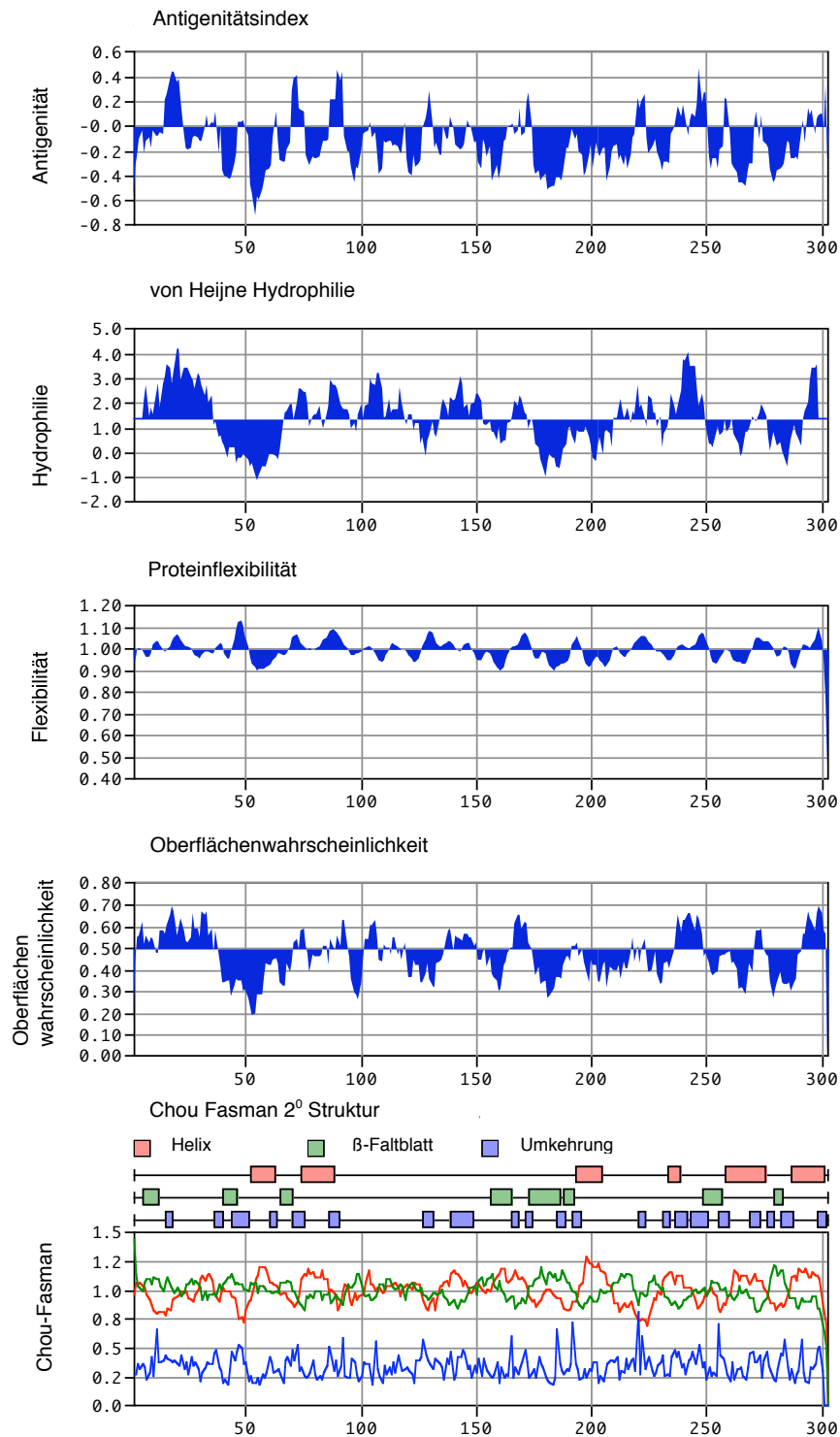
Das Fragment vom Start bis hin zum Stop-Codon ist 814 bp lang und der offene Leserahmen (ORF) kodiert für ein Protein von 271 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht des Proteins liegt bei 29.3 kDa und der pI-Wert beträgt 6.51. Im SDS-Gel zeigte das Protein mit Histidin-Anhang im Vergleich zu dem Standard ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa (s. Abb. 8).

Die Sequenz des Klons Ss-4 wurde in das Expressionsplasmid pQE-30 (QIAGEN) kloniert, und das Gen konnte durch die Zugabe von 0.1 mM IPTG exprimiert werden. Das rekombinante Protein wurde durch die Lyse der Bakterien in 6 M Harnstoff (s. Punkt 2.2.2.23.2.1) aus diesen gelöst. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte über die Bindung des Histidin-Anhangs an die Ni-NTA-Matrix. Die Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 hatte die Elution des Proteins zur Folge (s. Abb. 8).



**Abb. 8: Aufreinigung des Proteins von Klon Ss-4 über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein konnte durch Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 von der Matrix eluiert werden.



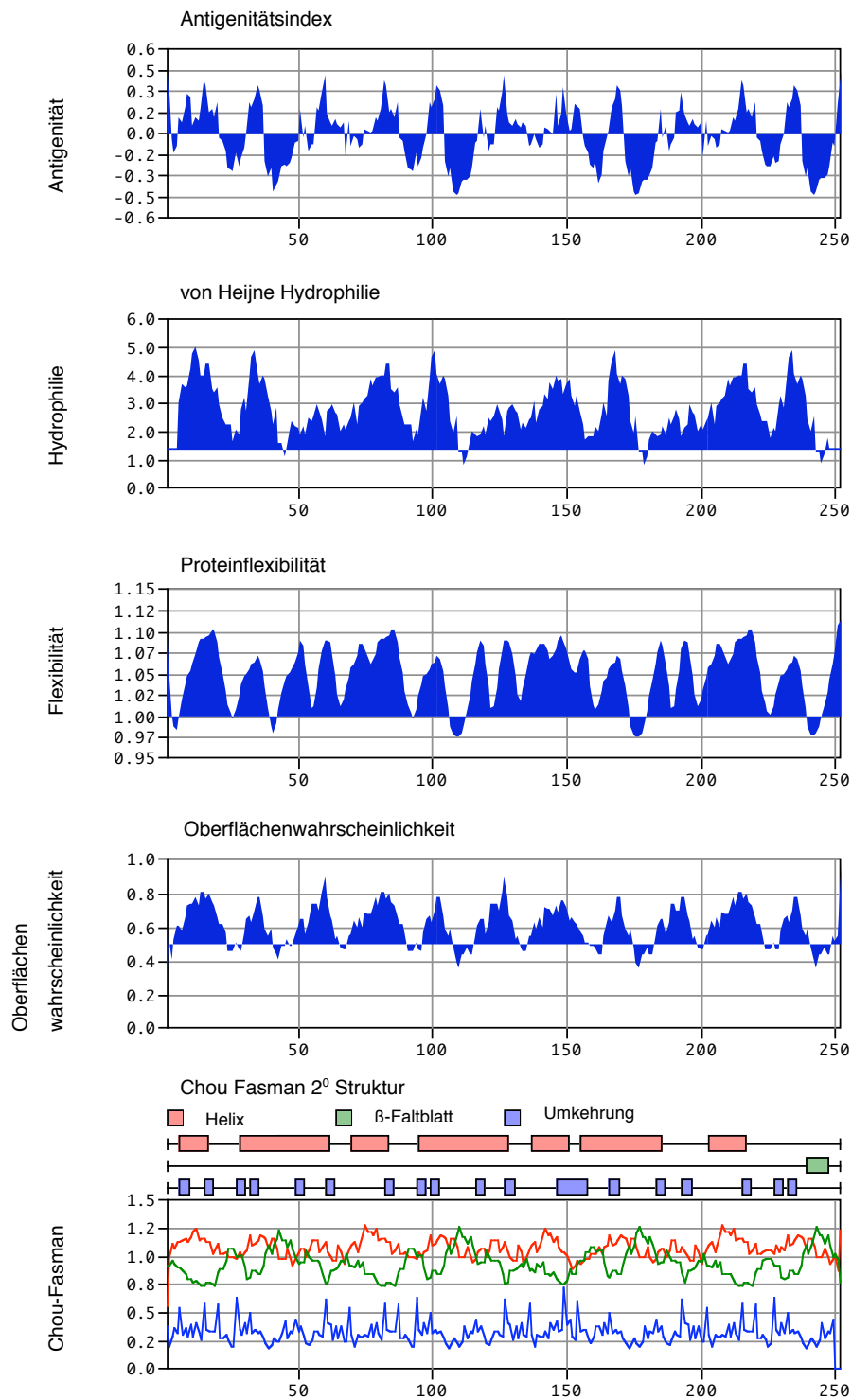


**Abb. 9: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-4.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilie, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

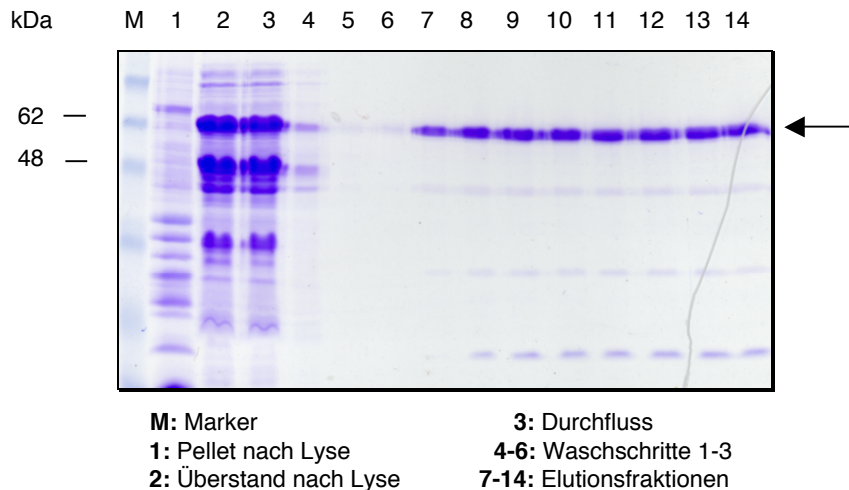
### 3.9.1.2 Klon Ss-7

Der Datenbankabgleich des Klons Ss-7 ergab in der BLASTX-Analyse unter Berücksichtigung geringer Komplexität der Sequenz Homologien zu dem Titin von *Drosophila melanogaster* (Acc. No.: DAA00021; E-Wert  $5e^{-14}$ ). In der BLASTN-Analyse anhand der EST-Datenbank konnten Homologien zu einem Klon von *S. scabiei* (Acc. No.: BM522179.1; E-Wert  $e^{-166}$ ) ermittelt werden. Der hier vorliegende Klon umfasst allerdings 328 bp mehr am 5'-Ende der Sequenz. Nach der Strukturanalyse beinhaltet das rekombinante Protein eine Reihe potenzieller Epitope. In diesen Bereichen treffen auch die Kriterien der erhöhten Proteinflexibilität, Hydrophilie und damit der Exponiertheit an der Oberfläche sowie die geringe Wahrscheinlichkeit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur zu (s. Abb. 10). Die polaren und damit epitopbestimmenden Aminosäuren Glutamat (19.69%) und Lysin (20.08%) sind verhältnismäßig häufig vertreten. Die Sequenz beinhaltet weder ein Start- noch ein Stop-Codon, so dass das Fragment am 5'-Ende ab Position 29 und am 3'-Ende stromaufwärts des vermeintlichen Poly-A-Anhangs kloniert wurde (s. Punkt 7.4.2). Das klonierte Fragment ist 724 bp lang und der offene Leserahmen kodiert für ein Protein von 241 Aminosäuren. Das errechnete Proteingewicht beträgt 27.3 kDa und der pI-Wert liegt bei 4.42. Inklusiv des Histidin-Anhangs zeigte das Protein im SDS-Gel im Vergleich zu dem Standard ein Molekulargewicht von 62 kDa (s. Abb. 11), was darauf hinweist, dass das Protein hier als Dimer vorliegt.

Die Sequenz des Klons Ss-7 wurde in das Expressionsplasmid pQE-32 (QIAGEN) kloniert, und eine Genexpression wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das rekombinante Protein konnte unter nativen Bedingungen (s. Punkt 2.2.2.23.2.1) aus den Zellen extrahiert werden. Die Aufreinigung erfolgte durch Bindung des Proteins über den Histidin-Anhang an die Ni-NTA-Matrix und die anschließende Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer von pH 5.9 auf pH 4.1 (s. Abb. 11).



**Abb. 10: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-7.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilie, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.



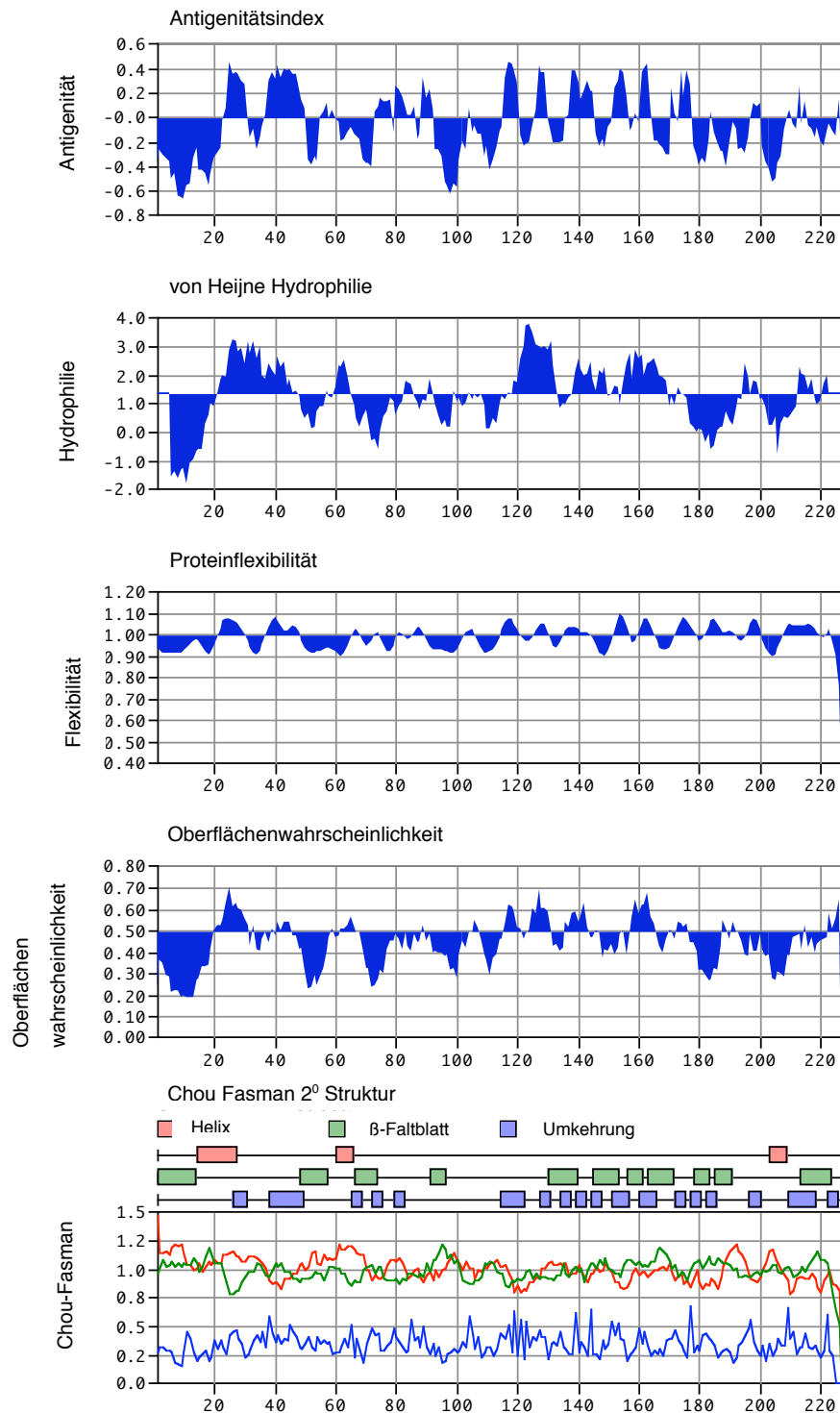
**Abb. 11: Aufreinigung des Proteins von Klon Ss-7 über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein konnte durch die Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.1 von der Matrix eluiert werden.

### 3.9.1.3 Klon Ss-17

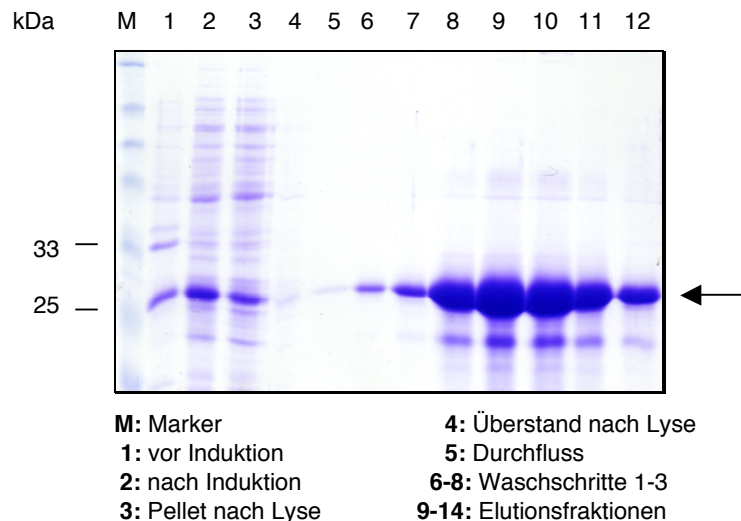
Der Klon Ss-17 zeigte in dem Abgleich mit der Expressed-Sequence-Tag (EST)-Datenbank Homologien (E-Wert: 0) zu dem Klon ESSU0292 (Acc. No.: BG817870) von *S. scabiei*. Der in dieser Arbeit identifizierte Klon umfasst allerdings 271 bp mehr am 5'-Bereich der Sequenz und beinhaltet ebenfalls den nicht translatierten Bereich (UTR) am 3'-Ende bis hin zum Poly-A-Anhang. An Position 63 folgt auf zwei Stop-Codons ein Start-Codon und an Position 744 das Stop-Codon. Es konnten keine signifikanten Homologien zu hypothetischen oder bereits charakterisierten Proteinen in der BLASTN-Analyse ermittelt werden. Eine BLASTP-Analyse ergab für dieses Protein Übereinstimmungen mit einer Protein Kinase C-konservierten Region verschiedener hypothetischer oder unbekannter Proteine (E-Wert 0.004). Die Strukturanalyse zeigte für dieses Protein wenige Epitope mit potenziell erhöhtem Antigenitätsindex (s. Abb. 12). Anhäufungen von bestimmten Aminosäuren, die zu dessen Erhöhung beitragen, liegen nicht vor. Für das vorliegende Protein wurde eine Signalsequenz vorhergesagt (SignalP V2.0 World Wide Web Server). Auf Grund der Tatsache, dass Signalsequenzen bei der rekombinanten Expression stören können, wurde das Gen stromabwärts der vorhergesagten Spaltungsstelle, die zwischen den ab dem Start-Codon gezählten Aminosäuren 18 (A) und 19 (Y) liegt, kloniert (s. Punkt 7.4.4). Das klonierte Fragment hat eine Größe von 628 bp und der ORF kodiert für ein Protein von 209 Aminosäuren. Das errechnete Proteingewicht liegt bei 23.3 kDa und der pI-Wert beträgt 9.36. Im SDS-Gel zeigte das Protein mit Histidin-

Anhang im Vergleich zum Standard ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa (s. Abb. 13). In dem hier durchgeführten Immunoscreening wurde ein weiterer Klon (*Ss-130b*) identifiziert, der ebenfalls Homologien (E-Wert:  $9e^{-73}$ ) zu dem Klon ESSU0292 von *S. scabiei* zeigte. Allerdings ist dieser Klon im Vergleich zu dem Klon *Ss-17* am 5'-Ende der Sequenz um 286 bp verkürzt.

Die Nukleotidsequenz des Klons *Ss-17* wurde für die Genexpression in das Plasmid pQE-30 (QIAGEN) kloniert. Die Genexpression konnte durch die Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert werden. Das rekombinante Protein wurde nur durch eine Lyse mit 6 M Guanidinium aus den Bakterien gelöst (s. Punkt 2.2.2.23.2.1). Die Elution des an die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN) gebundenen Proteins erfolgte ebenfalls durch die Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer von pH 5.9 auf pH 4.5 (s. Abb. 13).



**Abb. 12: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-17.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilität, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

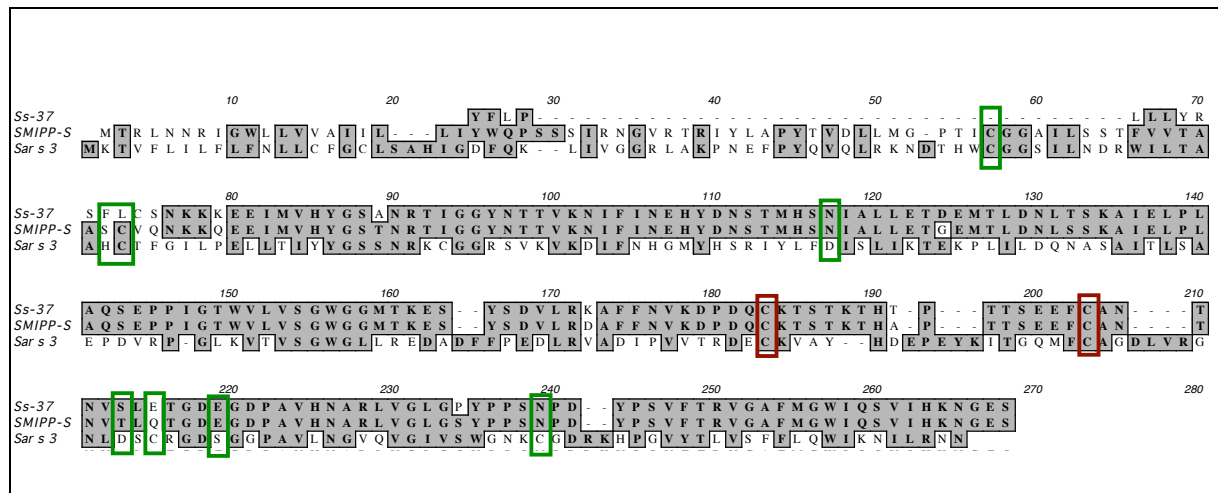


**Abb. 13: Aufreinigung des Proteins von Klon Ss-17 über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein konnte durch Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 von der Matrix eluiert werden.

### 3.9.1.4 Klon Ss-37

#### 3.9.1.4.1 Sequenzcharakterisierung und Aufreinigung des Proteins

Der Datenbank-Abgleich des Klons Ss-37 ergab in der BLASTX-Analyse Homologien zu einem der *SMIPP-S* (Scabies Mite Inactivated Protease Paralogues) von *S. scabiei* var. *hominis* (Acc. No.: AAR14083.1; E-Wert  $8e^{-82}$ ). Eine weitere bedeutende Homologie besteht zu dem Allergen *Derf III* von *D. farinae*, einer Serin-Protease (E-Wert  $2e^{-15}$ ). Das Protein *SMIPP-S* von *S. scabiei*, wie auch andere dieser Multigenfamilie werden als katalytisch inaktiv eingestuft, da sie keine intakte katalytische Triade enthalten (Holt et al. 2003). Das von den Autoren beschriebene Protein beinhaltet eine Signalsequenz, die allerdings in dem in dieser Arbeit isolierten Klon fehlt. Ein potenzielles Start-Codon ist zwar an Position 3 vorhanden, aber der Datenbank-Abgleich zeigt, dass in dem vollständigen Gen ein weiteres Start-Codon, das in dieser Sequenz nicht vorhanden ist, weiter stromaufwärts existiert. Das Stop-Codon befindet sich in der Sequenz an Position 606. Wie allen *SMIPPs* fehlt auch dem identifizierten Klon Ss-37 das aktive Serin im katalytischen Zentrum, das hier durch ein Glutamat ersetzt ist. Die katalytische Triade (H, D und S) in dem Klon Ss-37 ist nicht intakt. Vier der sechs konservierten Cysteine fehlen in dem Klon Ss-37, darunter auch die beiden das aktive Serin flankierenden (s. Abb. 14).



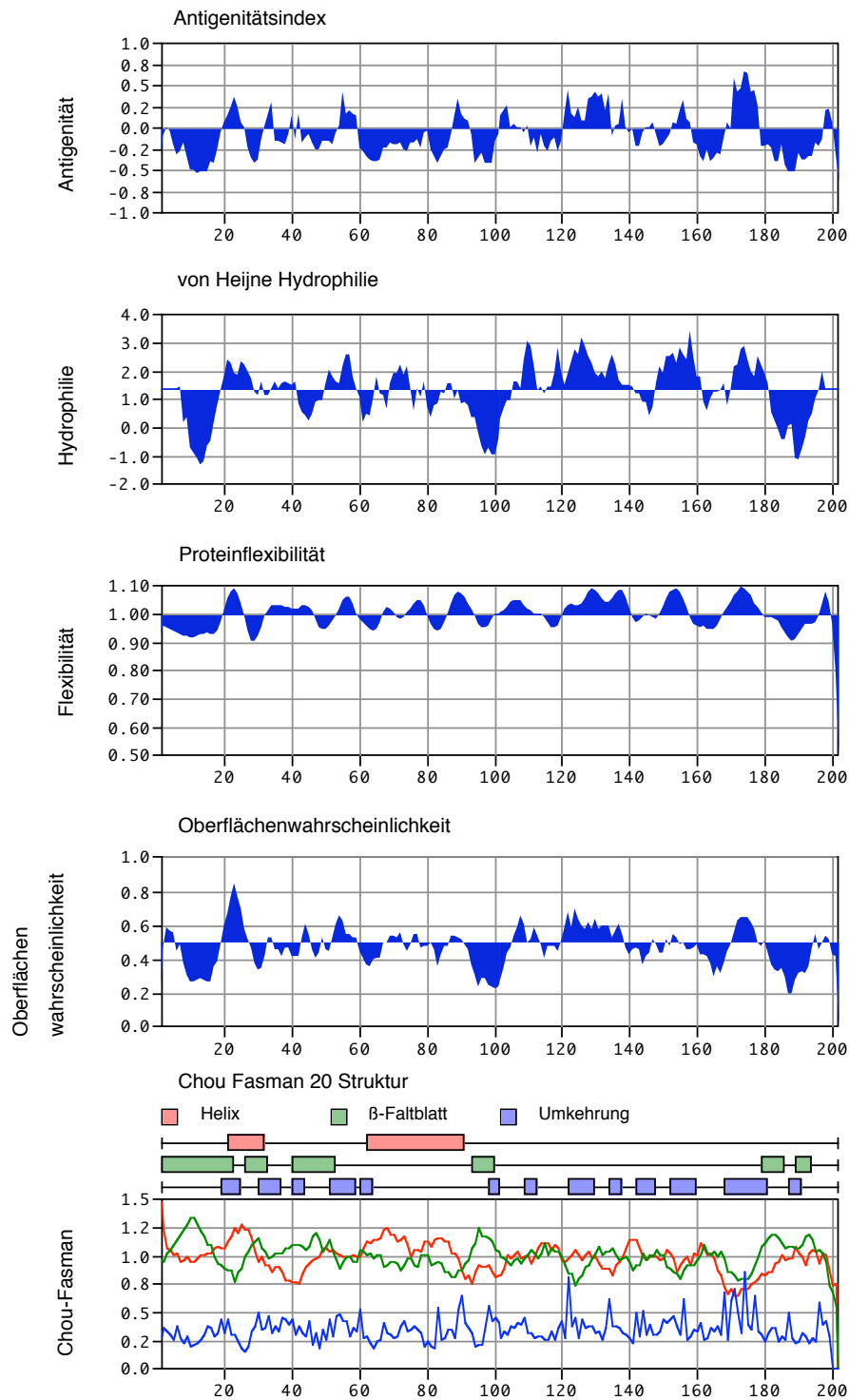
**Abb. 14: Alignment der Aminosäuresequenzen einer vermeintlich aktiven (*Sar s 3*) und einem inaktiven Serin-Protease Paralog (*SMIPP*) von *S. scabiei* sowie der des Klons *Ss-37*.** Die grünen Boxen markieren die Positionen, an denen konservierte Cysteine und die Aminosäuren, die entscheidend für die katalytische Aktivität und Spezifität des aktiven Proteins sind, in den inaktiven Proteinen durch andere Aminosäuren ersetzt sind. Die roten Boxen hingegen markieren die auch in den inaktiven Proteinen konservierten Cysteine.

In dem rekombinanten Protein sind wenige Epitope mit erhöhtem Antigenindex vorhanden. Das Antigen zeichnet sich auch nicht durch die Anhäufung spezieller Aminosäuren mit erhöhtem immunogenen Potenzial aus (s. Abb. 15).

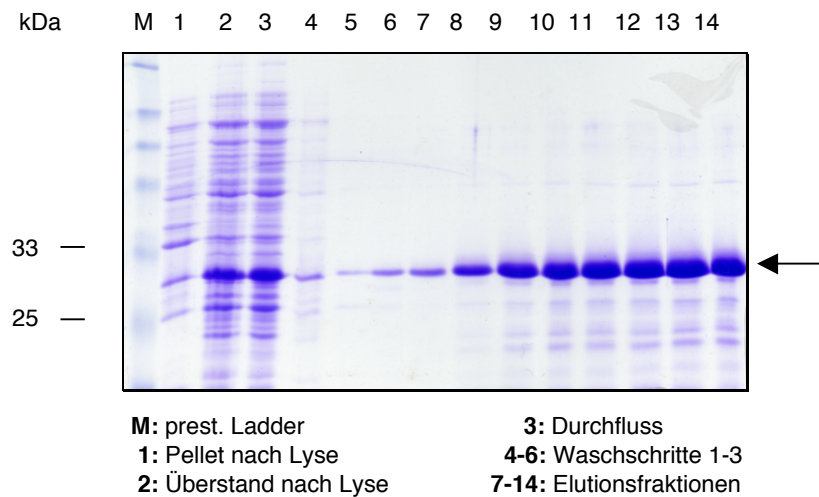
Das ab Position 19 klonierte Fragment ist 591 bp lang, während das Protein aus 197 Aminosäuren besteht. Das errechnete Proteingewicht beträgt 21.4 kDa und der pI-Wert beläuft sich auf 5.18. Das rekombinante Protein mit Histidin-Anhang zeigte im SDS-Gel im Vergleich zum Standard ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa (s. Abb. 16).

Die Nukleotidsequenz des Klons *Ss-37* wurde für eine Expression des Genfragmentes in das Plasmid pQE-32 (QIAGEN) kloniert. Eine Genexpression konnte durch die Zugabe von 0.1 mM IPTG induziert werden. Auch dieses rekombinante Protein wurde nur durch eine Lyse der Bakterienzellen in 6 M Guanidinium in den Überstand entlassen (s. Punkt 2.2.2.23.2.1). Nach Bindung an die Ni-NTA-Matrix erfolgte die Elution des Proteins durch die Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer von pH 5.9 auf pH 4.5 (s. Abb. 16).





**Abb. 15: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-37.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilie, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.



**Abb. 16: Aufreinigung des Proteins von Klon Ss-37 über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein wurde durch Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 von der Matrix eluiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur für eines der Proteine, die keine repetitiven Domänen enthalten, ein erhöhter Antigenindex vorausgesagt wird.

### 3.9.2 Antigene mit repetitiven Domänen

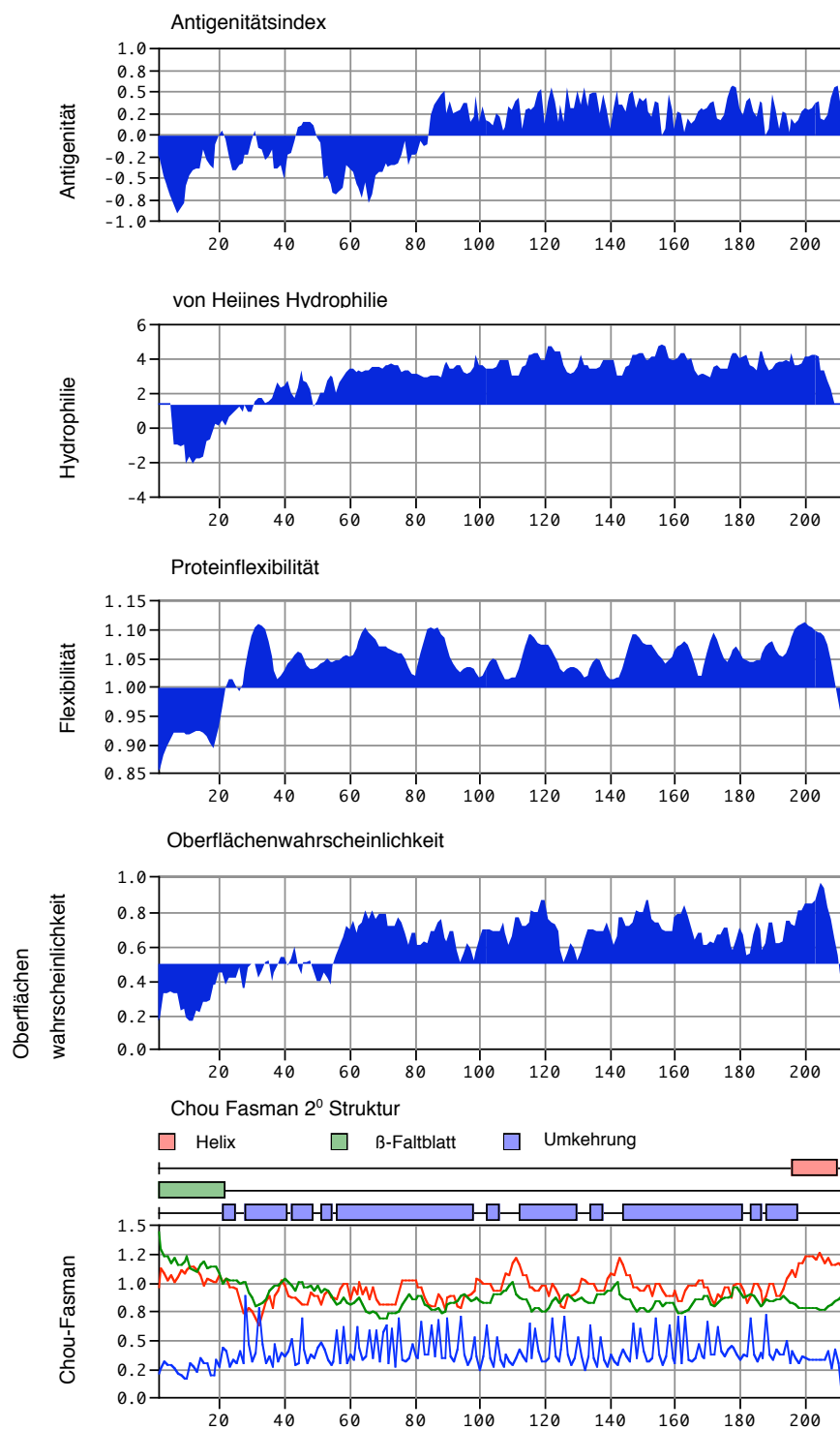
#### 3.9.2.1 Klon Ss-23

Der Klon Ss-23 zeigte im Datenbank-Abgleich (BLASTX unter Berücksichtigung geringer Komplexizität) eine Homologie zu der vorausgesagten Aminosäuresequenz eines Tyrosin-spezifischen Proteins einer Phosphatase-Familie (E-Wert  $1e^{-19}$ , Acc. No.: NP\_497450). Die vorliegende Sequenz beinhaltet in diesem Leserahmen stromabwärts mehrerer Stop-Codons an Stelle 172 ein Methionin. Dieses wurde hier als Start-Codon interpretiert, obwohl die Sequenz stromaufwärts der erwähnten Stop-Codons bereits zwei Start-Codons beinhaltet. Auch für dieses Protein wurde eine Signalsequenz (SignalP V2.0 World Wide Web Server) mit einer Spaltungsstelle zwischen den Aminosäuren 21 (A) und 22 (K), gezählt ab dem vermeintlichen Start-Codon, vorhergesagt, so dass das Gen stromabwärts dieser Spaltungsstelle kloniert wurde (s. Punkt 7.4.6). Stromaufwärts des Poly-A-Anhangs existiert kein Stop-Codon, so dass die Sequenz des Rückwärtsprimers für die Klonierung von der Sequenz direkt vor dem Poly-A-Anhang abgeleitet wurde. Das Protein inklusive der Signalsequenz beinhaltet einen hohen Anteil sowohl basischer Aminosäuren (29.47% Lysin (K) und 12.56% Histidin (H)), als auch der unpolaren Aminosäure Prolin (P) (17.87%). Das Protein weist einige repetitive Domänen auf (s. Abb. 17).

MIRFSVLFLLVFCATIYLIDAKGVSINPGGKPGGKHVGKSHRGTPFGKRLGGGHEPK  
 PHTKPKSKPKPKPPKPHPKKHHGKPSKPSPKKPGHRPGHKPAHKPRKPVHKKHHK  
KSPKPKRKKPGHRPGHKPAHKPRKPVHKKHHKKSPKPRKKPGHKPRKPNPKKHH  
GKPSKPSHRKSGHRKPGHKKPGRKHGKNKKESEKKKKKKK

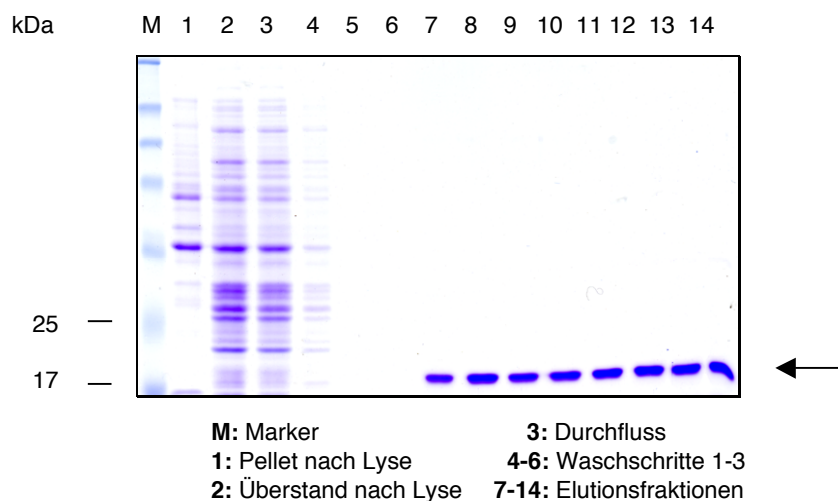
**Abb. 17: Repetitive Domänen in dem Protein des Klons Ss-23.** Die Domänen sind farblich (rot und blau) gekennzeichnet.

Die Strukturanalyse sagt für dieses rekombinante Protein diverse Epitope mit erhöhtem Antigenitätsindex voraus. Umkehrungen in der Polypeptidkette, bedingt durch den hohen Anteil des Prolins, sind auffällig. Der Vorhersagewert für die Hydrophilie und damit einer hohen Oberflächenwahrscheinlichkeit sowie der Flexibilität dieser Bereiche tragen zu dem Antigenitätsindex bei (s. Abb. 18).



**Abb. 18: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-23.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilität, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

Das klonierte Fragment hat eine Größe von 624 bp und der ORF umfasst ein Protein von 208 Aminosäuren. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde ein weiterer Klon identifiziert, dessen Sequenz mit der des vorliegenden Klons *Ss-23* übereinstimmt, allerdings geringfügige Abweichungen, u. a. ein Stop-Codon vor dem Poly-A-Anhang, am 5'-Ende aufweist. Das errechnete Proteingewicht des Klons *Ss-23* liegt bei 20 kDa und der pI-Wert beträgt 12.96. Im SDS-Gel zeigte das Protein mit Histidin-Anhang im Vergleich zu dem Standard ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa (s. Abb. 19). Die Nukleotidsequenz des Klons *Ss-23* wurde für eine Expression des Gens in das Plasmid pQE-30 (QIAGEN) kloniert. Eine Genexpression konnte nach der Zugabe von 1 mM IPTG beobachtet werden. Das rekombinante Protein wurde nur durch eine Lyse der Bakterien in 6 M Guanidinium in den Überstand entlassen (s. Punkt 2.2.2.23.2.1). Nach der Bindung an die Ni-NTA-Matrix wurde das Protein durch die Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer von pH 5.9 auf pH 4.5 eluiert (s. Abb. 19).



**Abb. 19: Aufreinigung des Proteins von Klon *Ss-23* über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein wurde durch Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 von der Matrix eluiert.

### 3.9.2.2 Klon Ss-97

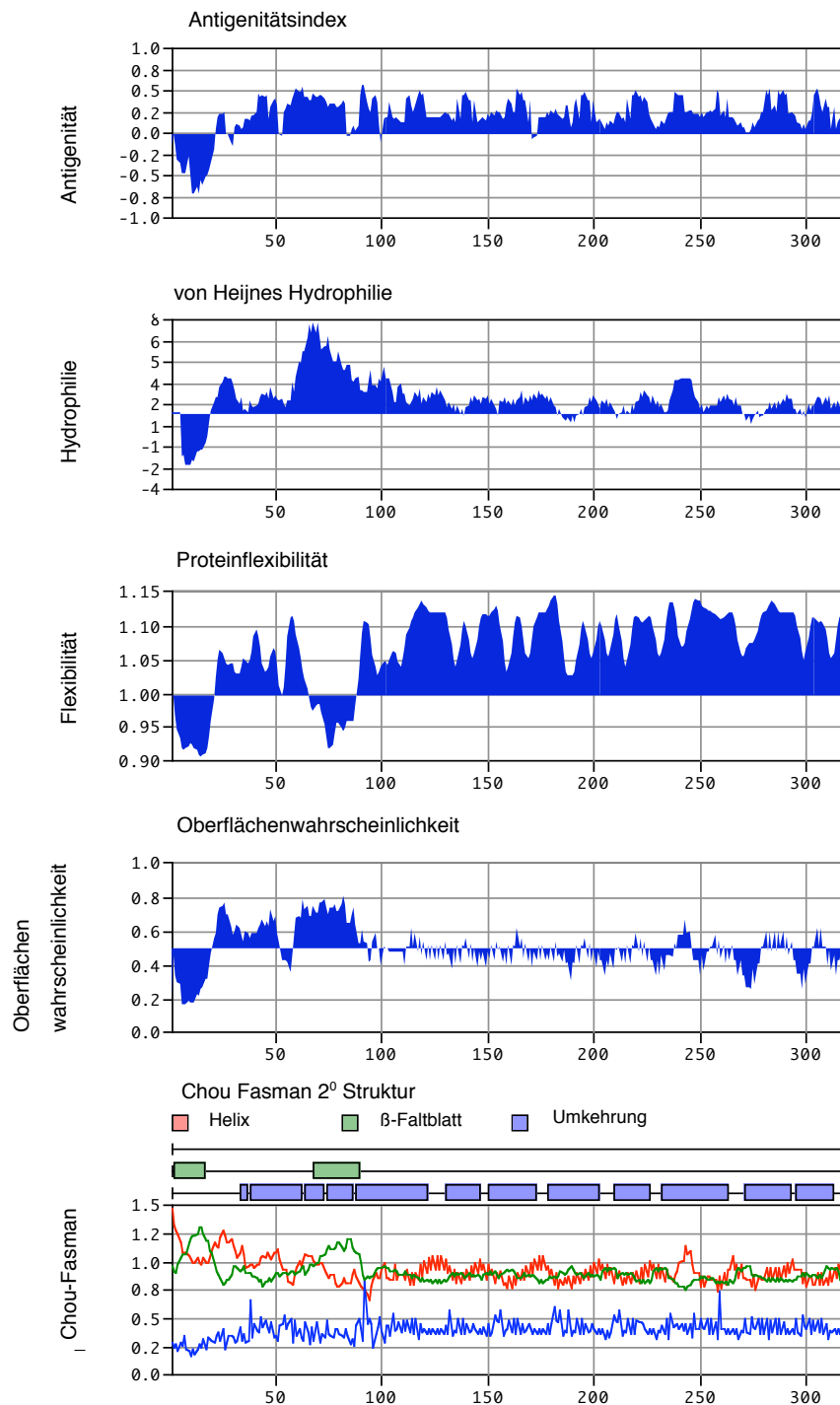
Der Klon Ss-97 zeigte im Datenbank-Abgleich (BLASTN) Homologien zu diversen cDNA-Sequenzen von *S. scabiei* var. *hominis*. Der E-Wert beträgt z. B. 0 in einem Alignment mit dem Klon ESSU0100 (Acc. No.: BG817678). Eine BLASTX-Analyse mit dem Klon Ss-97 ergab eine Homologie zu einer ovariellen, Fibroin ähnlichen Substanz 2 von *Cyprinus carpio* (E-Wert:  $2e^{-64}$ ; Acc. No.: AAG25717.1). Auf vier Stop-Codons in der Sequenz folgt an Position 112 ein Start-Codon. Ein terminales Stop-Codon fehlt in der vorliegenden Sequenz. Auch für dieses Protein wurde eine Signalsequenz (SignalP V2.0 World Wide Web Server) mit einer Spaltungsstelle zwischen den auf das Start-Methionin folgenden Aminosäuren an Position 22 (Q) und 23 (K) vorhergesagt, auf Grund dessen das Gen stromabwärts dieser Spaltungsstelle kloniert wurde (s. Punkt 7.4.8). Die Sequenz weist einige repetitive Domänen auf (s. Abb. 20).

KMKLLCLFIGLLVFVISIHLVQKEDKELRSELYKSQLSPTQNDMNNNHKSKLRCCG  
SKGTDKRHRRRCRHRRYRHRYYYRRYYYRRYIYKRGGPNRGRMRRGGMRGRNGM  
GKGRGKGKGQGEGEGEGEGEGEKGWGKGKGKGHGEGEGETGESNGKGWG  
RGKGKGKGHGEGEGEEGEGSSNGKGWGKGWGKGKGKGHGEGEGEVGESN  
GKGWGKGKGKGDGEGEGEVGEKGQGGDEDEGEQGGEKGKGKGPGE  
GEGEGEVGEGGAGGKGKGKGQGGKGKGGEGEGEGMGGKGKGRGKGKGVG  
EGEGEGEGKKKKKKKKKK

**Abb. 20: Repetitive Domänen im Protein des Klons Ss-97.** Einige repetitive Domänen sind farblich (rot, blau und schwarz) markiert.

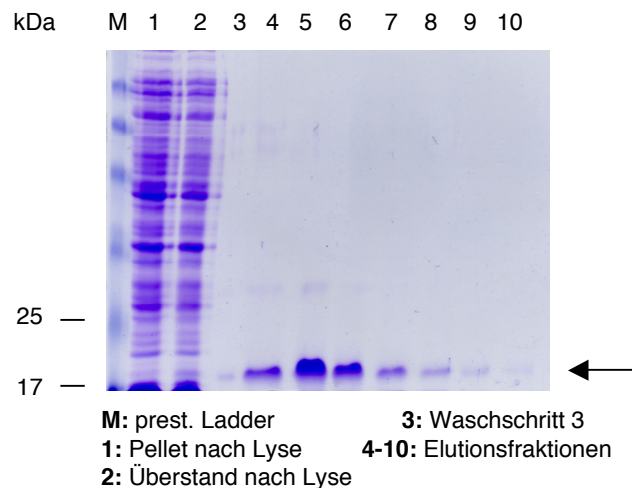
Das klonierte Fragment ist 861 bp lang und das Protein setzt sich aus 287 Aminosäuren zusammen. Das errechnete Proteingewicht beläuft sich auf 29.3 kDa und der pI-Wert liegt bei 9.59. Im SDS-Gel zeigte das rekombinante Protein im Vergleich zu dem Standard ein Molekulargewicht von lediglich etwa 19 kDa (s. Abb. 22). Der Anteil der unpolaren Aminosäure Glycin (35.45%) und der polaren Aminosäure Glutamat (15.76%) in dem gesamten Protein inklusive der Signalsequenz ist auffallend hoch. Besonders auffällig sind in diesem Zusammenhang die hohe Wahrscheinlichkeit der Umkehrungen innerhalb der Polypeptidkette, bedingt durch das häufige Auftreten der Aminosäure Glycin, sowie

der hohe Flexibilitätsindex. Diese Zusammensetzung trägt zu einem theoretisch erhöhten Antigenitätsindex der Epitope bei (s. Abb. 21).



**Abb. 21: Strukturanalyse bezüglich der Immunogenität des Proteins von Klon Ss-97.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilie, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

Die Nukleotidsequenz des Klon *Ss-97* wurde in das Expressionsplasmid pQE-30 (QIAGEN) kloniert. Die Genexpression konnte durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden. Auch dieses rekombinante Protein wurde nur nach einer Lyse der Bakterien mit 6 M Guanidinium in den Überstand entlassen (s. Punkt 2.2.2.23.2.1). Das Protein wurde dann durch die Absenkung des pH-Wertes im Elutionspuffer von pH 5.9 auf pH 4.3 von der Matrix eluiert (s. Abb. 22).



**Abb. 22: Aufreinigung des Proteins von Klon *Ss-97* über die Ni-NTA-Matrix (QIAGEN).** Das Protein wurde durch Absenkung des pH-Wertes von pH 5.9 auf pH 4.5 von der Matrix eluiert.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Immunoscreening wurden zwei weitere Klone identifiziert, die Homologien zu dem Klon BG817678 zeigen.

### 3.9.2.3 Klon *Ss-134*

Der Klon *Ss-134* zeigt in der BLASTN-Analyse eine Homologie (E-Wert 0.0) zu einem EST-Klon von *S. scabiei* (Acc. No.: BM276606). Allerdings beinhaltet der hier vorliegende Klon die UTR-Region bis hin zum Poly-A-Anhang sowie 278 bp am 5'-Ende der Sequenz, die in dem Klon aus der Datenbank fehlen. Bei dem hier vorliegenden Klon war kein eindeutiges Start-Codon ermittelbar. In der Sequenz tritt zunächst ein potenzielles Start-Codon auf, auf das allerdings mehrere Stop-Codons folgen. An Position 320 ist dann ein weiteres Start-Codon vorhanden, welches hier auch als solches gewertet wurde, trotzdem es stromabwärts eines potenziellen Start-Codons und mehreren Stop-Codons liegt. Ein Datenbank-Abgleich (BLASTX unter Berücksichtigung geringer Komplexizität) ergab, dass in diesem Leserahmen



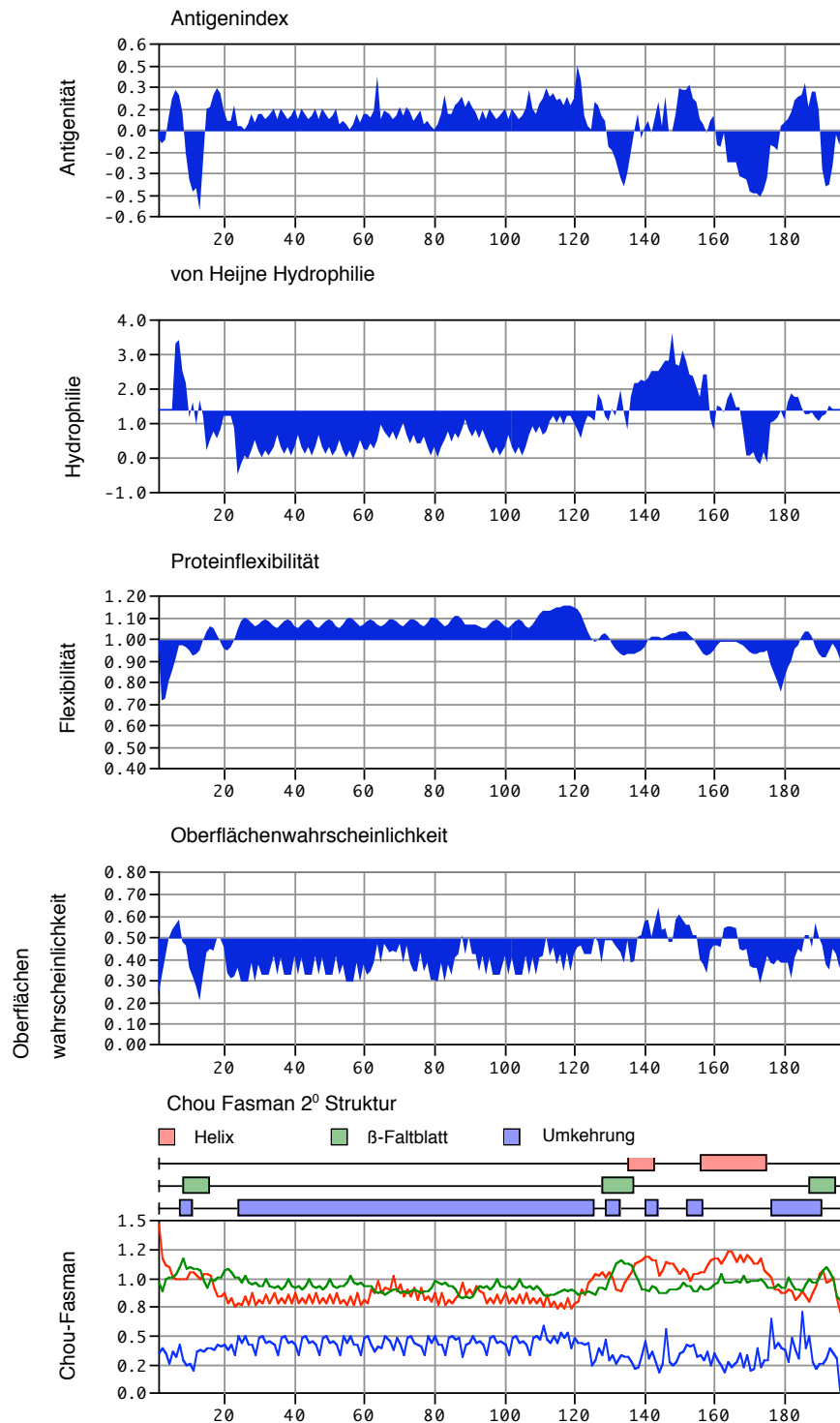
ebenfalls Homologien zu einer ovariellen, Fibroin ähnlichen Substanz 4 von *C. carpio* (Acc. No.: AAG25719) mit einem E-Wert von  $1e^{-45}$  besteht. Auf Grund dieser Homologie wurde dieser Leserahmen mit dem erwähnten Start-Codon gewählt. Ein Stop-Codon liegt in diesem Leserahmen an Position 1304. Auch diese Sequenz beinhaltet einige repetitive Domänen (s. Abb. 23).

MVSKEEWGSQQGGQEVTIVQTGNTFDGQDLMVGQQGLGGQQGMMGQQGYGG  
QQGMMGQQGFGGQQGFGGQQGMMGQQGFGGQQGMMGQQGLSGQQGMMGQ  
QGFGGQQGAGNQQGMMGQGSQGSSGQNGFPFGFIQGLFLLGIKNGFGY  
 GFGQGSGFGQGNGFGQGNGFGQGNGFGQGSGFGQGNGMSQGNSLG  
 QGNGLGQGSGFGQGNGNAQGNGFGQGNGFGQGNGFGQGNGNGQGSQSGQG  
 >NNLGLENTCRVVYSLEAMRNRALQPLETARRSCNAAFNLERLVEQLNAVLANLAPY  
 XGRCAYGPSQYWLRAIGSK\*

**Abb. 23: Repetitive Domänen in dem Protein des Klons Ss-134.** Die Domänen sind farblich (rot und blau) dargestellt.

Der Anteil an polaren Aminosäuren (32.22% Glycin und 17.33% Glutamin) ist in diesem Protein außerordentlich hoch. Der Bereich, in dem sich die Glycine häufen, ist durch die potenzielle Umkehrung der Polypeptidkette (s. Abb. 24) gekennzeichnet. Diese Umkehrungen und das Vorhandensein der polaren Aminosäuren tragen zu der Erhöhung des Antigenindex dieses Bereiches bei. Die Wahrscheinlichkeit der Exponiertheit durch einen erniedrigten Hydrophilieindex ist in diesem Bereich gering, während der Flexibilitätsindex erhöht ist.

Das klonierte Fragment umfasst 971 bp und kodiert für ein Protein mit dem Molekulargewicht von 32.8 kDa und der pI-Wert liegt bei 8.45. Dieses Gen konnte nicht exprimiert werden.



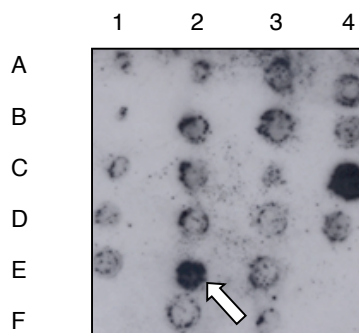
**Abb. 24: Potenzielle Immunogenität des Proteins von Klon Ss-134.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilie, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

### 3.9.2.4 „KE-reiche Antigene“-kodierende Klone

#### 3.9.2.4.1 DNA-Hybridisierung

Die Sequenzierung der Klone, die im ersten Schritt des Auswahlverfahrens für „*Sarcoptes*-spezifische Klone“ (s. Punkt 3.8) identifiziert worden waren, ergab eine hohe Frequenz der Klone, die für „KE-reiche Antigene“ kodieren. Auf Grund dessen wurde eine DNA-Hybridisierung mit allen bislang unbekannten Klonen durchgeführt, so dass weitere, derartige Klone identifiziert werden konnten, ohne dass eine Sequenzierung vorgenommen werden musste.

Die DNA-Hybridisierung (s. Abb. 25) ergab, dass 23 der 34 Klone, die in der amplifizierten Bank gefunden wurden, die Sequenzen enthalten, die sich durch einen zentralen GA-repetitiven Bereich auszeichnen, und deren Proteine hier „KE-reiche Antigene“ genannt werden. Dagegen befinden sich nur drei dieser Klone unter den insgesamt 27 isolierten aus der nicht amplifizierten Bank. Auf Grund dieser Diskrepanz ist anzunehmen, dass diese Klone während der Amplifikation der Bank überproportional vermehrt worden sind. Diese Klone sind insgesamt 26 Mal (42.6%) während des Immunoscreening isoliert worden. Dies lässt auf eine hohe Immunreaktivität der Proteine schließen.



**Abb. 25: DNA-Hybridisierung mit den im Immunoscreening isolierten Klonen unter Verwendung der GA-repetitiven Sonde.** An Position C4 wurden die Positivkontrolle und an Position D4 die Negativkontrolle aufgetragen. Position E2 zeigt eine positive Reaktion der Sonde mit dem Klon, während alle weiteren hier dargestellten Klone als negativ bewertet wurden.

### 3.9.2.4.2 Sequenzanalyse

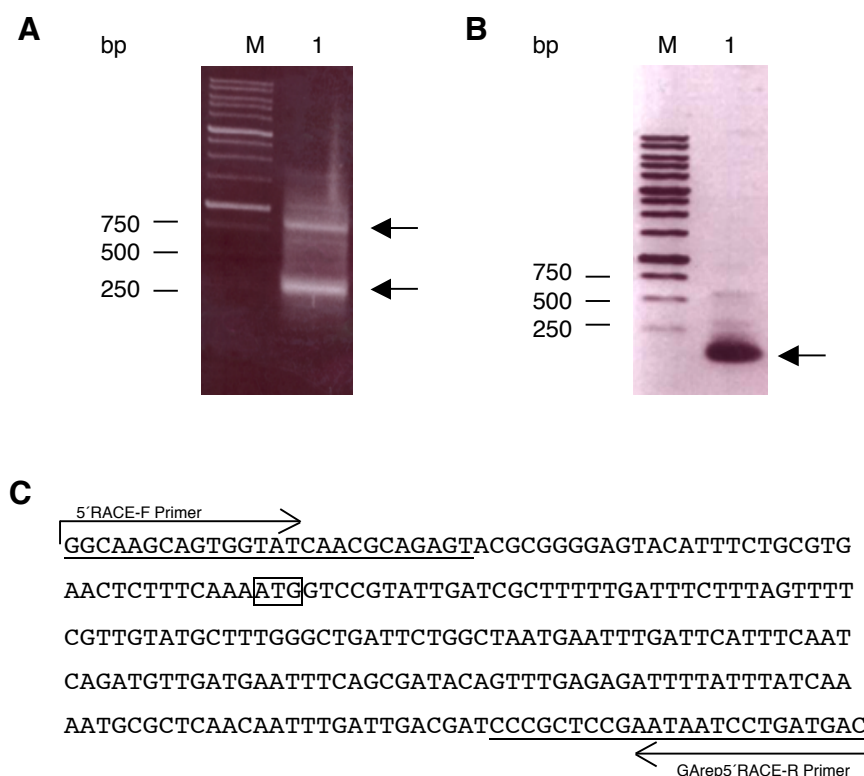
Für die Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, waren keine Homologien zu bereits charakterisierten Proteinen in der BLASTX-Analyse ermittelbar. Es bestehen allerdings Homologien zu einem hypothetischen Protein von *Plasmodium falciparum* (Acc. No.: NP\_700900). Der E-Wert war hier variabel (für Klon *Ss-14* beträgt er  $2e^{-47}$ ), abhängig davon, welcher Klon in der Analyse eingesetzt wurde. Die BLASTN-Analyse unter Verwendung der EST-Datenbank ergab Homologien zu einer Sequenz aus der cDNA von teilweise sporulierten Oozysten des Protozoen *Toxoplasma gondii* (Acc. No.: BM131944). Auch hier war der E-Wert abhängig davon, welcher der Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, in der BLAST-Analyse eingesetzt wurde. Für den Klon *Ss-14* betrug er beispielsweise  $2e^{-25}$ . Bei den Sequenzanalysen wurde die geringe Komplexität der Klone berücksichtigt.

Es wurden insgesamt 12 Klone sequenziert, die die besagten „KE-reichen Antigene“-kodierenden Sequenzen enthalten. Aus den Sequenzierungen wurde ersichtlich, dass diese Klone trotz hoher Konservierung auch Abweichungen untereinander aufweisen. Allen Klonen ist ein zentraler GA-repetitiver Bereich gemein, deren ORF für die Aminosäuren Glutamat (E) und Lysin (K) kodiert. Die Länge dieses Bereiches variiert zwischen einigen Klonen; z. B. unterscheidet sich der Klon *Ss-10* durch einen erheblich längeren, und der Klon *Ss-20* durch einen kürzeren repetitiven Bereich von den übrigen Klonen (s. Abb. 27). Auch die Länge der 5'- und 3'-Bereiche variiert zwischen den unterschiedlichen Isolaten (s. Abb. 27).

Die Sequenzierung konnte keinen Aufschluss darüber geben, ob die isolierten Klone vollständige 5'-Enden enthielten, und es sich bei dem in Abb. 27 markierten Start-Codon um den tatsächlichen Translationsstart handelte. Für die Ermittlung der Translations-Startposition wurde zunächst eine PCR mit der cDNA-Bank unter Verwendung phagenspezifischer Vorwärts- und sequenzspezifischen Rückwärtsprimer für die Klone *Ss-14* und *Ss-18* durchgeführt. Die Sequenzierung der amplifizierten Fragmente ergab keinen weiteren Aufschluss über den 5'-Bereich der Sequenzen, als es durch die bereits isolierten, sequenzierten Klone möglich war.

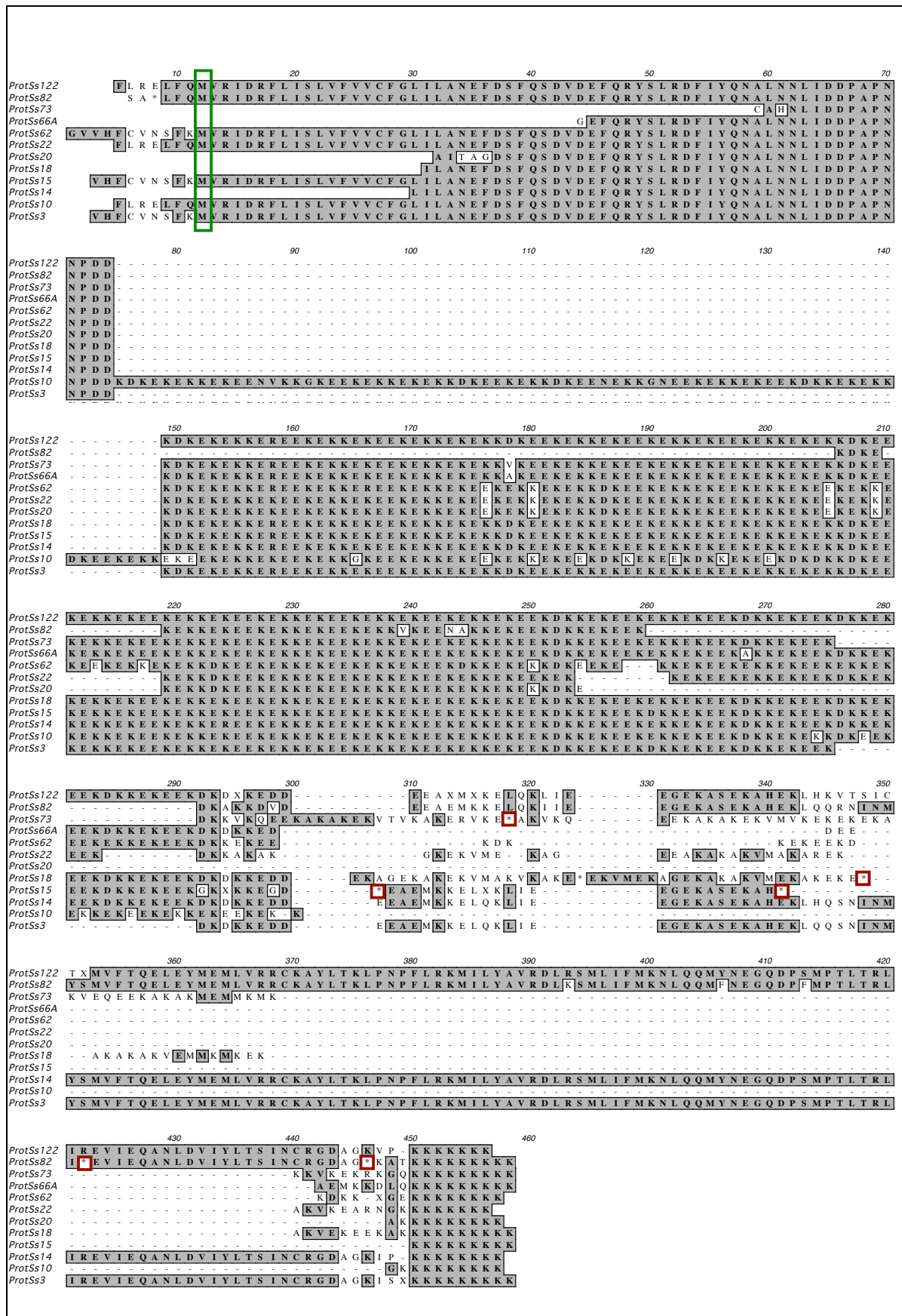
Mittels der RACE-Analyse wurden unter Verwendung des Rückwärtsprimers GArep5'RACE-R, der in einer konservierten Region der sequenzierten repetitiven Sequenzen band, Fragmente der Größe von etwa 250 bp aus der cDNA amplifiziert. Die Klonierung dieses DNA-Schmiere und die anschließende Sequenzierung von fünf

verschiedenen Klonen zeigten, dass sich hinter den in Abb. 26A markierten etwa 250 bp großen Amplifikaten vier verschiedene Amplifikate mit kleinen Größenunterschieden verbargen. Es handelte sich allerdings nur bei einem 253 bp-Fragment um die spezifische Amplifikation des 5'-Endes der gesuchten Sequenz. In dieser Sequenz wurde das in Abb. 27 markierte Start-Codon bestätigt. Eine Kozak-Sequenz war allerdings nicht identifizierbar. Die Sequenzierung des etwa 760 bp großen Fragmentes ergab eine unspezifische Amplifikation einer *Sarcoptes*-Sequenz (Genbank Acc. No. BM276587.1). Die PCR, die mit dem Rückwärtsprimer RACE5'-Ss18R durchgeführt wurde, sollte das 5'-Ende der Sequenz, das aus dem Klon Ss-18 abgeleitet werden konnte, aus der Gesamt-cDNA vollständig amplifizieren. Die Sequenzierung des in Abb. 26B markierten etwa 100 bp großen Fragmentes ergab ebenfalls ein unspezifisches Produkt, deren Sequenz mit keiner *Sarcoptes*-Sequenz in der öffentlichen Datenbank übereinstimmte.



**Abb. 26: Amplifikation der 5'-Enden der für „KE-reiche Antigene“ kodierenden Sequenzen mittels der RACE-PCR. A:** Darstellung der Fragmente im Agarosegel, die unter Verwendung eines Rückwärtsprimers, der eine konservierte Region aller bekannten für „KE-reiche Antigene“ kodierenden Klone repräsentiert, amplifiziert wurde. **B:** Darstellung des Fragmentes im Agarosegel, das unter Verwendung eines Ss-18-spezifischen Primers amplifiziert wurde. Hierbei handelt es sich um ein unspezifisches Produkt **C:** Die Sequenzierung eines der Fragmente (253 bp) aus **A** ergab die dargestellte Sequenz. Bei dem hier markierten Start-Codon handelt es sich um dasselbe, wie bei dem in Abb. 27 markierten.

In den Klonen *Ss-15*, *Ss-18*, *Ss-73* und *Ss-82* ist jeweils ein Stop-Codon vorhanden, das in der Abb. 27 in Form eines Sternchens markiert ist, während dieses bei den anderen sequenzierten Klonen fehlt. Die Klone *Ss-14* und *Ss-18* wurden für eine Aufreinigung des rekombinanten Antigens in Expressionsvektoren kloniert. Lediglich der Klon *Ss-18* konnte in dem System pET-41(+) erfolgreich exprimiert und das Protein aufgereinigt werden.

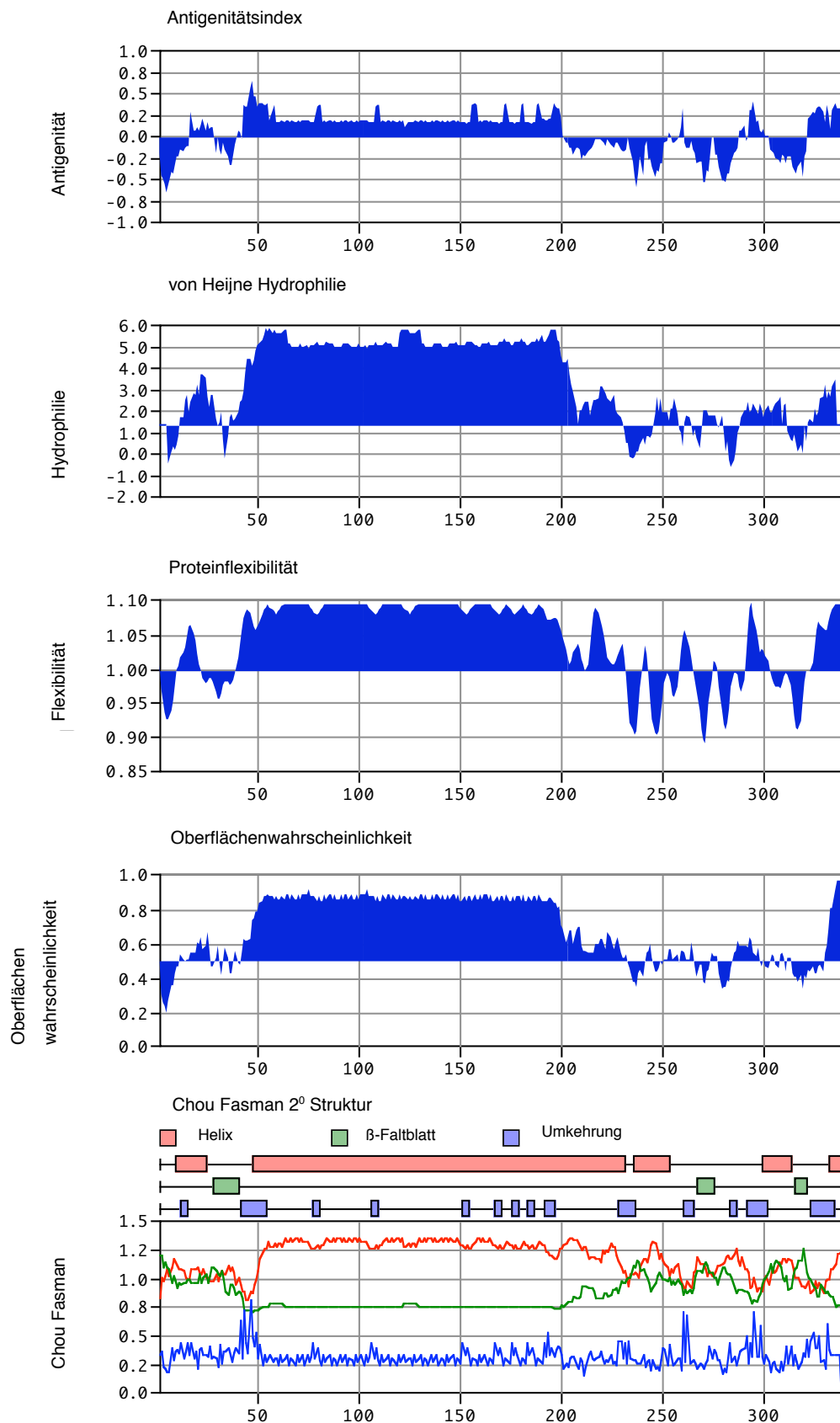


**Abb. 27: Alignment der Aminosäuresequenz von den sequenzierten, für „KE-reiche Antigene“ - kodierenden Klonen.** Die Box an Position 13 (grün) markiert das putative Start-Codon der Klone. Stop-Codons werden in roten Boxen indiziert.

#### **3.9.2.4.3 Strukturanalyse**

Die Strukturanalyse des Proteins von Klon *Ss-14* wurde stellvertretend für die für „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klone durchgeführt (s. Abb. 28). Diese ergab einen erhöhten Antigenindex für die repetitive Region. Die Region zeichnet sich durch eine Hydrophilie sowie durch eine Flexibilität der Aminosäuren aus. Auf Grund der Hydrophilie besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass diese Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls exponiert sind. Für diesen Bereich wird außerdem die Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix vorhergesagt. Der Klon *Ss-14* ist im Vergleich zu z. B. dem Klon *Ss-62* am 5'-Ende verkürzt. Die Sequenz des Klons *Ss-62* beinhaltet ein Signalpeptid, dessen Spaltstelle zwischen den Aminosäuren Alanin (A) und Asparagin (N) an Position 34/35 liegt.





**Abb. 28: Strukturanalyse des kompletten Proteins von Klon Ss-14.** Dargestellt sind die Vorhersagen für den Antigen-Index, die Hydrophilität, die Flexibilität und Exponiertheit bestimmter Aminosäuren an der Oberfläche des Moleküls sowie die Sekundärstruktur. Die Werte wurden mittels des Programms MacVector (Accelrys) ermittelt.

#### 3.9.2.4.4 Klon Ss-14

Das für die Genexpression klonierte Fragment von *Ss-14*, in dem weder ein Start- noch ein Stop-Codon zu identifizieren waren, umfasst 997 bp. Der ORF bis hin zum Poly-A-Anhang kodiert für ein Protein mit einem Gewicht von 40.3 kDa und der pI-Wert liegt bei 5.45.

Die Aminosäuren Glutamat (23.82%) und Lysin (27.35%) sind auffallend häufig vertreten. Dieses Gen konnte in dem System pQE exprimiert, aber das rekombinante Protein nicht aufgereinigt werden. Nach einer Klonierung in die Vektoren pET-28 und pET-41a (+) wurde keine Expression detektiert.

#### 3.9.2.4.5 Klon Ss-18

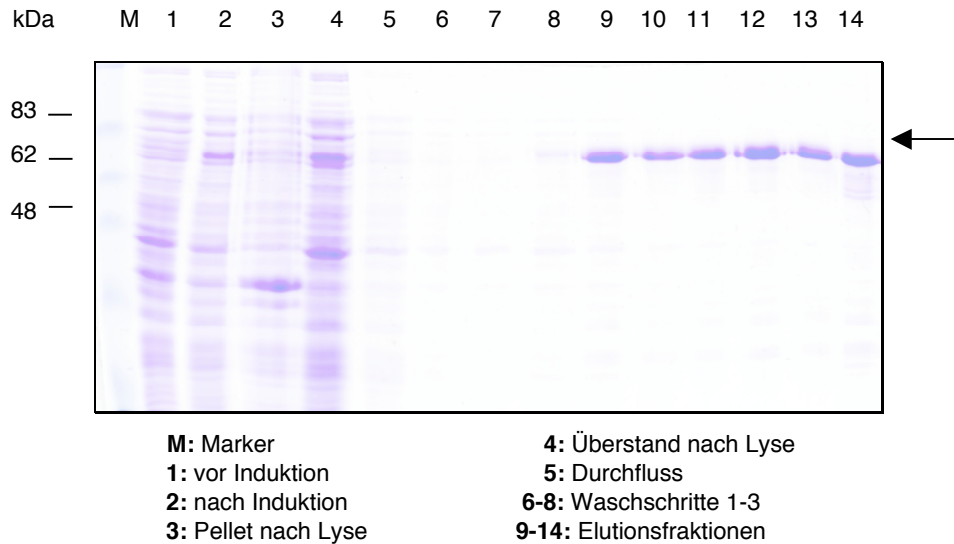
In dem Klon *Ss-18* befindet sich an Position 728 ein Stop-Codon, allerdings fehlt in dieser Sequenz ein Start-Codon. Das für die Expression klonierte Fragment beinhaltet 658 bp und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Der pI-Wert beträgt 5.65. Der Anteil von Glutamat (31.96%) sowie der von Lysin (37.44%) und ist auch hier auffallend hoch. Wie alle anderen für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klone enthält auch der Klon *Ss-18* repetitive Domänen (s. Abb. 29).

LRPGILANEFDSFQSDVDEFQRYSLRDFIYQNALNNLIDDPAPNNPDDKDKEKEKKE  
REEKEKKEKEEKEKKEKEKKDKEKEKKEKEEKEKKEKEEKEKKEKEKKDKEKEK  
KEKEEKEKKEKEEKEKKEKEEKEKKEKEEKEKKEKEEKDKKEKEEKEKKEKEEKDK  
KEKEEKDKKEKEEKDKKEKEEKDKDKKEDDEKAGEKAKEKVMKVKAKE\*

**Abb. 29: Repetitive Domänen in dem Protein des Klon Ss-18.** Der Klon ist stellvertretend für die anderen Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, dargestellt, bei denen sich die Domänen entsprechend der Sequenz von den hier dargestellten unterscheiden. Hier sind zwei unterschiedliche Domänen (rot und blau markiert) gezeigt.

Das Gen wurde in dem Expressionssystem pET-41a (+) durch die Zugabe von 1 mM IPTG als GST-Fusion-protein exprimiert. Im Vergleich zu dem Größenstandard beträgt das Molekulargewicht dieses Fusionsproteins etwa 70 kDa (s. Abb. 30). Das Protein konnte auf Grund der Fusion mit dem löslichen GST unter nativen Bedingungen (s. Punkt 2.2.2.23.2.1) aus den Bakterienzellen extrahiert werden.

Nach Bindung an die Glutathion-Sepharose-Matrix wurde das Protein durch die Zugabe von reduziertem Glutathion von dieser eluiert (s. Abb. 30).



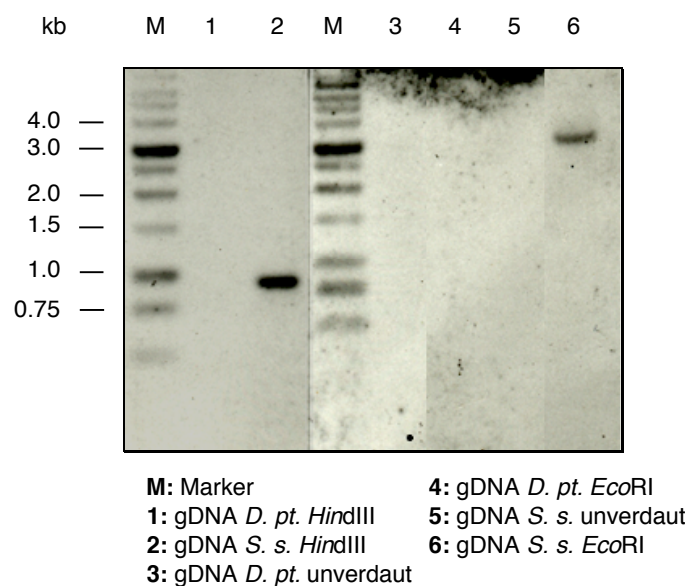
**Abb. 30: Aufreinigung des Proteins von Klon Ss-18/GST über die Glutathione Sepharose® 4B-Matrix (Pharmacia).** Das Protein wurde durch die Zugabe von red. Glutathion von der Matrix eluiert.

Die Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, wurden häufig isoliert, und diese Tatsache ließ auf eine hohe Immunogenität der Proteine schließen. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Antigene unternommen.

### 3.9.2.4.6 Detektion der für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Gene in *S. scabiei* und *D. pteronyssinus*

In den Hausstaubmilben konnten mittels der Reversen Transkription der mRNA und anschließender PCR keine Transkripte der Gene detektiert werden, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren. Eine Southern-Blot Analyse mit der gDNA sowohl von *S. scabiei* als auch von *D. pteronyssinus* wurde durchgeführt, um die Spezifität dieser Sequenzen für die *Sarcoptes*-Milben zu überprüfen. Des Weiteren diente dieser Versuch der Ermittlung der Kopienanzahl des „KE-reicher Antigene“-kodierenden Gens in *S. scabiei*.

Wie auch mittels der PCR konnte durch die Southern Blot-Analyse kein für „KE-reiche Antigene“-kodierendes Gen in den Hausstaubmilben nachgewiesen werden. In den *Sarcoptes*-Milben wiederum konnte nur eine Kopie dieses für die Milben spezifischen Gens, sowohl in der mit *EcoRI* als auch in der mit *HindIII* geschnittenen gDNA, detektiert werden (s. Abb. 31).



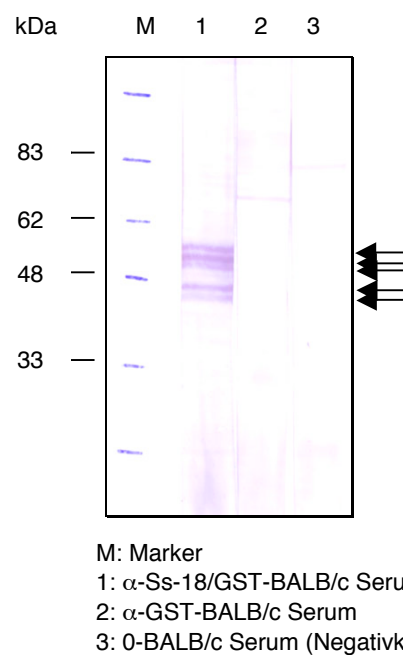
**Abb. 31: Southern Blot Analyse zur Detektion der „KE-reichen Antigene“-kodierenden Sequenzen im Genom von *S. scabiei* (*S.s.*) und *D. pteronyssinus* (*D. pt.*).** Im Gegensatz zu *S. scabiei* ist bei *D. pteronyssinus* kein Gen nachweisbar, das für die „KE-reichen Antigene“ kodiert. Bei *S. scabiei* wurde von diesem Gen eine Kopie nachgewiesen.

In der gDNA, die mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten wurde, ist eine Bande auf der Höhe von ca. 3.4 kb sichtbar, während diese in der mit *HindIII* geschnittenen gDNA nur eine Größe von etwa 900 bp aufweist. Der Grund für die

verkürzte Sequenz liegt vermutlich in einer unbekannten *Hind*III-Schnittstelle in einem Intron. Die Sonde, die hier verwendet wurde, bindet im 5'-Bereich des Gens.

#### 3.9.2.4.7 Nachweis der „KE-reichen Antigene“ in SsGesamtantigenen

Die Anzahl der exprimierten Transkripte, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, sollte ermittelt werden. Zu diesem Zweck waren BALB/c-Mäuse mit dem rekombinanten Protein von Klon *Ss-18/GST* immunisiert worden. Dieses Antiserum ( $\alpha$ -*Ss-18/GST*) wurde im Western Blot, unter Verwendung des Gesamtantigens der *Sarcoptes*-Milben, eingesetzt. In einem 10%igen SDS-Gel wurden fünf Banden identifiziert, die mit dem Positiv-, nicht aber mit dem Negativserum oder dem der Mäuse, die mit reinem GST immunisiert worden waren, reagierten (s. Abb. 32). Die Größe dieser „KE-reichen Proteine“ bewegte sich zwischen etwa 45 kDa und 55 kDa.



**Abb. 32: Western Blot mit SsGesamtantigenen zum Nachweis der „KE-reichen Antigene“.** Mittels des  $\alpha$ -*Ss-18/GST*-Serums wurden fünf Proteinbanden detektiert.

### 3.9.2.4.8 Lokalisation der „KE-reichen Antigene“ in *S. scabiei*

Für eine weitere Charakterisierung der „KE-reichen Antigene“ wurde aus diesen die Aminosäuresequenz dreier Bereiche, aus dem N- und C-Terminus sowie der zentralen KE-reichen Region, abgeleitet. Anhand dieser Sequenz wurden drei Peptide synthetisiert. Diese Peptide wurden an das Trägerprotein KLH gekoppelt und damit BALB/c-Mäuse immunisiert, um deren Serum in immunhistochemischen Untersuchungen einsetzen zu können. Durch die Antikörperreaktion mit Epitopen aus dem nativen Protein in der Milbe sollte eine Lokalisierung der Proteine ermöglicht werden.

#### 3.9.2.4.8.1 Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit KLH-gekoppelten Peptiden

Der Ellmann's Assay zur Ermittlung der Kopplungseffizienz von den Peptiden an das KLH ergab, dass nach der Inkubation der Peptide mit dem KLH keine freien Sulfhydrylgruppen mehr detektierbar waren, was auf eine Kopplungseffizienz von 100% hinweist.

Die Immunantwort der BALB/c-Mäuse, die mit den synthetischen Peptiden A2, B2 und D2 immunisiert worden waren, wurde im ELISA mit einem anti-IgG-konjugierten Antikörper gemessen. Als Antigen wurden hier die ungekoppelten Peptide verwendet, so dass eine Reaktion gegen das Peptid und nicht gegen das KLH nachgewiesen wurde. Bei allen Mäusen konnten Antikörperantworten gegen die jeweiligen Peptide, mit denen sie immunisiert worden waren, verzeichnet werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4: Antikörperantworten der mit den synthetischen Peptiden immunisierten BALB/c-Mäuse gegen die jeweiligen Peptide.** Die Immunantwort wurde mittels eines anti-IgG-Konjugates im ELISA ermittelt und in den Wellenlängen OD<sub>450/630</sub> gemessen. In Klammern sind die Standardabweichungen angegeben. Die Verdünnung der eingesetzten Seren betrug hier 1/200.

	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8	Maus 9
<b>Peptid A2</b>	0.89 (± 0.065)	0.942 (± 0.02)	0.269 (± 0)	-	-	-	-	-	-
<b>Peptid B2</b>	-	-	-	0.864 (± 0)	1.083 (± 0.02)	0.808 (± 0.09)	-	-	-
<b>Peptid D2</b>	-	-	-	-	-	-	1.134 (± 0.05)	0.892 (± 0.01)	0.76 (± 0.01)

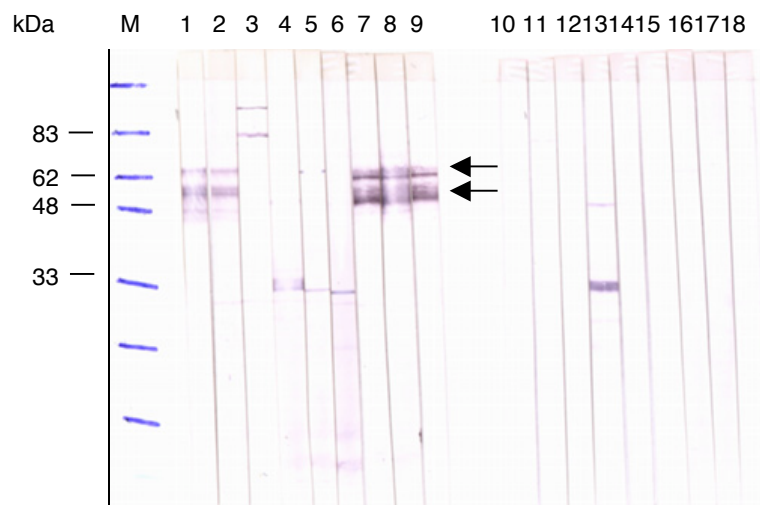
Es wurde außerdem ein ELISA mit KLH als Antigen durchgeführt. Es konnte bei keinem der neun Seren eine Immunantwort gegen das KLH detektiert werden.

Ein ELISA mit Gesamtantigen von *S. scabiei* ergab keine deutliche Reaktion der Seren der neun Mäuse. Lediglich das Serum der Maus 1, die mit dem Peptid A2 immunisiert worden war, zeigte reproduzierbar bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen eine etwa vierfach so starke Reaktion, wie bei den Seren gegen die beiden anderen Peptide. Die Reaktion gegen das Peptid A2 lag hier allerdings nicht höher als  $OD_{450/630}$  0.05 (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Antikörperantworten der mit den synthetischen Peptiden immunisierten BALB/c-Mäuse gegen SsGesamtantigen.** Die Immunantwort wurde mittels eines anti-IgG-Konjugates im ELISA ermittelt und in den Wellenlängen  $OD_{450/630}$  gemessen. In Klammern sind die Standardabweichungen angegeben. Die hier dargestellten Werte wurden anhand einer Serumverdünnung von 1/50 ermittelt.

	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8	Maus 9
<b>Peptid A2</b>	0.045 ( $\pm 0.005$ )	0.02 ( $\pm 0$ )	0.006 ( $\pm 0.002$ )	-	-	-	-	-	-
<b>Peptid B2</b>	-	-	-	0.012 ( $\pm 0$ )	0.011 ( $\pm 0$ )	0.013 ( $\pm 0.002$ )	-	-	-
<b>Peptid D2</b>	-	-	-	-	-	-	0.008 ( $\pm 0.01$ )	0.007 ( $\pm 0$ )	0.011 ( $\pm 0$ )

Der Western Blot mit dem aufgetrennten Protein des Klon *Ss-14* exprimiert in pTriplEx ergab lediglich eine Reaktion der Seren von Maus 1 und 2, die mit dem Peptid A2 immunisiert worden waren (s. Abb. 33). Wie aus Tab. 4 ersichtlich wird, war der gemessene Wert der Antikörperantwort gegen das Peptid A2 von Maus 3 auch um das etwa 3.6fache geringer als der der beiden anderen Mäuse. Alle drei Seren der Mäuse, die gegen das Peptid D2 immunisiert worden waren, erkannten das rekombinante Protein von Klon *Ss-14* (s. Abb. 33). Keine Reaktion war hingegen mit dem  $\alpha$ -Peptid-B2-Serum detektierbar. Diese Domäne war den Antikörpern offensichtlich nicht zugänglich.



**Abb. 33: Detektion des rekombinanten Protein von Klon *Ss-14* durch die Seren der mit den Peptiden A2, B2 und D2 immunisierten BALB/c-Mäuse Western Blot.** M: Marker. Die Spuren 1-9 stellen jeweils die Reaktion der Seren von den immunisierten Tieren dar (Spur 1-3: Tier 1-3 immunisiert mit Peptid A2; Spur 4-6 Tier 1-3 immunisiert mit Peptid B2; Spur 7-9 Tier 1-3 immunisiert mit Peptid D2; Spuren 10-18: Reaktionen der korrespondierenden 0-Seren). Die Pfeile markieren die jeweiligen positiven Reaktionen.

Der Western Blot mit Gesamtantigenen von *S. scabiei* ergab hingegen keine Reaktion der Seren. Der Grund dafür könnte in der geringen Konzentration dieser Proteine im SsGesamtantigen, das in der Western Blot-Analyse verdünnt wurde, liegen. Auf Grund der Reaktion im Western Blot mit dem rekombinanten Protein von Klon *Ss-14* und des äußerst gering erhöhten Wertes im ELISA wurde das Serum der BALB/c-Maus 1, die mit dem Peptid A2 immunisiert worden war, für die folgenden immunhistochemischen Untersuchungen verwendet.



### **3.9.2.4.8.2 Immunhistochemische Versuche zur Lokalisation der „KE-reichen Antigene“ in *S. scabiei***

Die Gefrierschnitte wurden mit *Sarcoptes*-Milben durchgeführt, die im Vorfeld nicht nach Geschlecht getrennt worden waren. Anhand der Schnitte ist nicht nachzuvollziehen, um welches Geschlecht es sich bei den Individuen handelt, in denen im Folgenden die beschriebene Struktur detektiert wurde.

#### **3.9.2.4.8.2.1 Detektion mit FITC-markierten Antikörpern**

Für eine Lokalisation der immunreaktiven repetitiven Proteine in den *Sarcoptes*-Milben wurde zunächst versucht, diese mittels FITC-markierter Antikörper in Gefrierschnitten zu detektieren. Auf diese Weise wurde im posterioren Teil des Opisthosomas der *Sarcoptes*-Milben eine paarige Struktur markiert (s. Abb. 34). Diese paarige Struktur konnte allerdings in diesen Schnitten, auf Grund der geringen Vergrößerung im Lichtmikroskop, nicht näher charakterisiert werden. In Milben, die ein Ei enthielten und damit eindeutig als Weibchen identifiziert werden konnten, wurde diese Struktur nicht detektiert.

#### **3.9.2.4.8.2.2 Detektion mit Peroxidase-markierten Antikörpern**

Mittels der Peroxidase-markierten Antikörper konnte die paarige Struktur in den Kryoschnitten der *Sarcoptes*-Milben nicht detektiert werden. Trotz der Inaktivierung der endogenen Peroxidase traten hier hohe unspezifische Hintergrundsreaktionen auf, so dass eine Identifizierung der Struktur nicht möglich war.

#### **3.9.2.4.8.2.3 Methylenblaufärbung von *S. scabiei*-Semidünnschnitten**

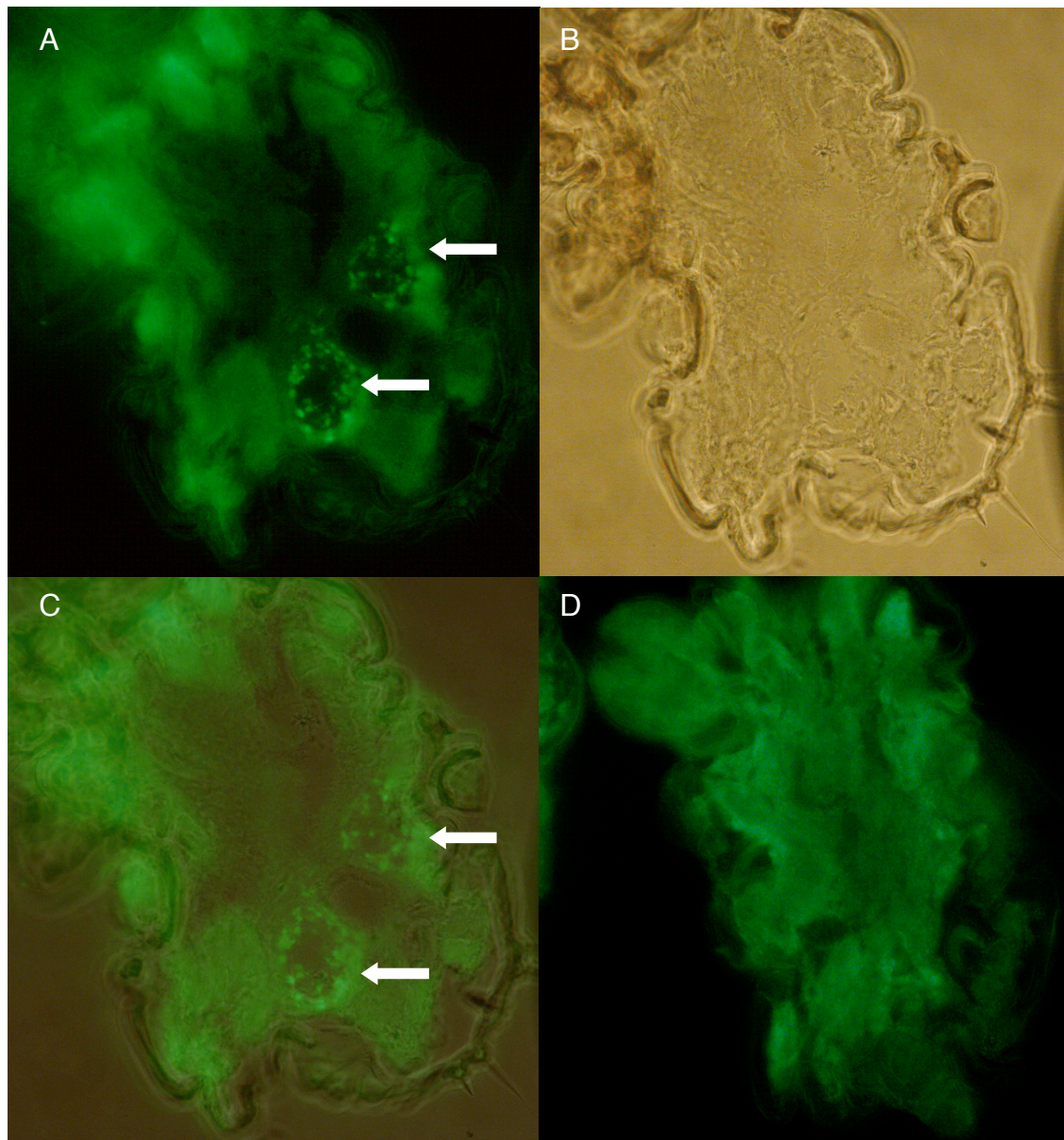
Die Methylenblaufärbung der Semidünnschnitte von *Sarcoptes*-Milben zeigt eine paarige Struktur im posterioren Teil des Opisthosomas (s. Abb. 35). Die Form und Position dieser Struktur entsprach der, die mit den FITC-markierten Antikörpern in den Gefrierschnitten detektiert wurde. Allerdings konnte diese Struktur auch hier nicht näher charakterisiert werden. Auf Grund der ähnlichen Form und Position

wurde die hier ermittelte Struktur in elektronenmikroskopischen Aufnahmen näher untersucht.

#### 3.9.2.4.8.2.4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

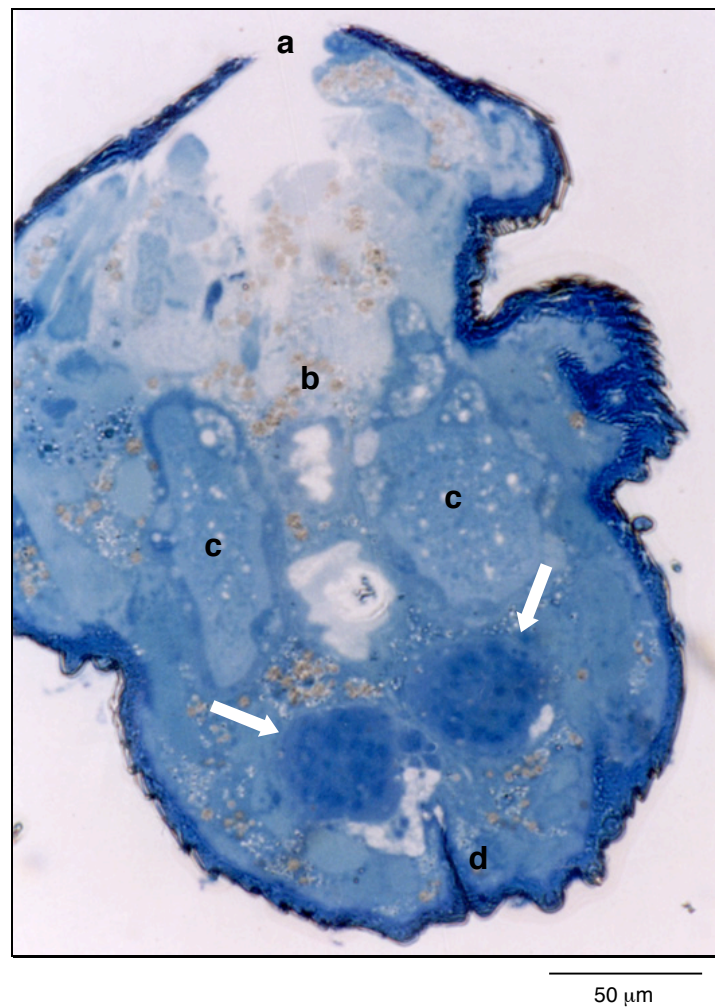
Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der paarigen Struktur, die in den Methylenblau-gefärbten Schnitten sichtbar wurde, ließen nähere Rückschlüsse über ihre Identität zu. Anhand dieser Aufnahmen kann man annehmen, dass es sich hier um die Hoden der *Sarcoptes* Milben handelt. In diesem Bereich werden verschiedene Nuklei sichtbar, die nach einer weiteren Teilung in das nächste Stadium der Spermatogenese übergehen (s. Abb. 36; persönliche Mitteilung Dr. G. Brennan, Queens University Belfast).

Die in Abb. 36 markierte Region zeigt einen Teil der paarigen Struktur, die mittels der Methylenblaufärbung sichtbar wurde. Auf Grund der Tatsache, dass es sich auch hierbei um ein paariges Organ handelt und die Position dieser Struktur in etwa der durch die FITC-markierten Struktur entspricht, wurde vermutet, dass es sich hier um ein und dasselbe Organ handelt. Allerdings konnte die Identität nicht geklärt werden, da zu diesem Zweck elektronenmikroskopische Aufnahmen mit parallelen Immunogoldfärbungen in einem Individuum nötig sind.

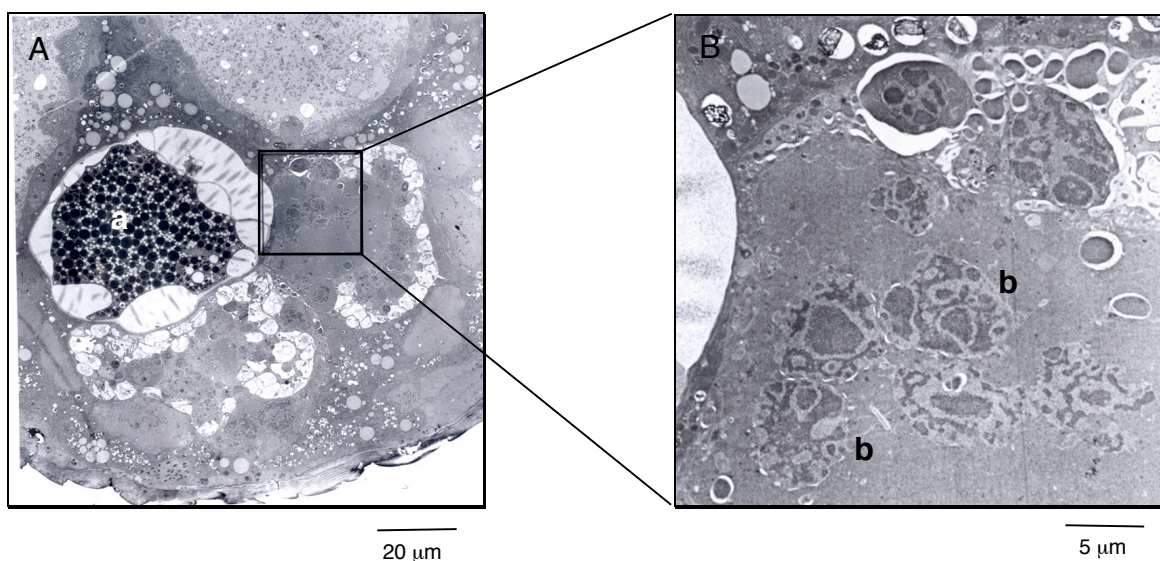


**Abb. 34: Lokalisation der immunreaktiven „KE-reichen Antigene“: Immunhistochemische Detektion einer paarigen Struktur im posterioren Teil des Opisthosomas von *S. scabiei* var. *bovis*.** **A:** Unter Verwendung eines gegen das repetitive Peptid A2 gerichteten BALB/c-Serums und eines FITC-markierten Antikörpers konnte die markierte Struktur in Gefrierschnitten von den Milben nachgewiesen werden. **B:** Lichtmikroskopische Aufnahme der untersuchten Milbe **C:** Übereinander gelegte Bilder aus **A** und **B** **D:** Anhand eines negativen Kontrollserums wurde diese Struktur in dem darauffolgenden Gefrierschnitt nicht detektiert.





**Abb. 35: Methylenblaufärbung eines Semidünnschnittes von *S. scabiei*.** Pfeile markieren ein paariges Organ im posterioren Opisthosoma einer Milbe unbekannten Geschlechts. **a:** abgetrennter Kopf, **b:** braune Bestandteile: Fettzellen, **c:** Struktur wird in den folgenden Schnitten unpaar, **d:** Anus



**Abb. 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme der paarigen Struktur aus Abb. 35 in einem darauffolgenden Schnitt. B:** Feindarstellung der in A dargestellten Struktur. **a:** Proteinansammlungen, **b:** Nuklei

Ziel dieser Arbeit war es, rekombinante Antigene zu identifizieren, mittels derer eine kostengünstige aber zuverlässige und hochspezifische Serodiagnostik der *Sarcoptes*-Infektion ermöglicht wird. Die Antigene sollten sowohl auf ihr immundiagnostisches Potenzial bei einer Krätze-Infektion beim Menschen als auch auf das bei einer Räude-Infektion beim Tier überprüft werden. Ein ELISA mit SsGesamtantigenen unter Verwendung von Humanseren (s. Abb. 2) zeigte, dass die Serodiagnose von *Sarcoptes*-Infektionen beim Menschen unter den gewählten Umständen nicht möglich ist.

Im Folgenden sind die serologischen Ergebnisse, die unter Verwendung der in dieser Arbeit isolierten rekombinanten Antigene erzielt wurden, dargestellt.

### 3.10 Immundiagnostisches Potenzial der rekombinanten Antigene

Ein ELISA unter Einsatz aller rekombinanten Antigene wurde durchgeführt, um die Spezifität dieser Antigene zu testen. Es wurden parallel Seren von *Sarcoptes*-positiven und -negativen Personen bzw. Schweinen eingesetzt. In den dargestellten Versuchen wurden die Seren in einer Verdünnung 1/200 eingesetzt, die sich auch hier als optimal erwiesen hatte. Insgesamt war eine extrem hohe Hintergrundsreaktion bei den Schweineseren zu beobachten. Die Vermutung, dass es sich dabei um eine Reaktion gegen *E. coli*-Protein, das in den Eluaten des rekombinanten Proteins vorhanden sein konnte, handelte, liegt nahe. Allerdings führte auch eine Präabsorption der Schweineseren mit *E. coli*-Protein zu keiner Reduktion dieser Hintergrundsreaktion.

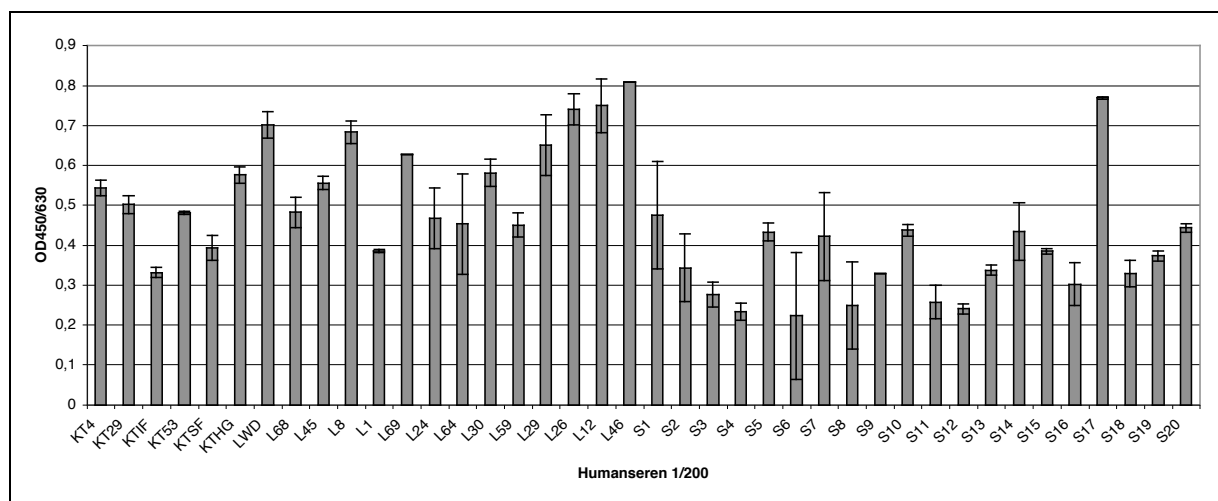
Das Humanserum S17, das mit allen Antigenen eine überdurchschnittlich hohe Reaktion zeigte, stammte nachweislich von einem Hausstaubmilbenallergiker.

#### 3.10.1 Klon Ss-4

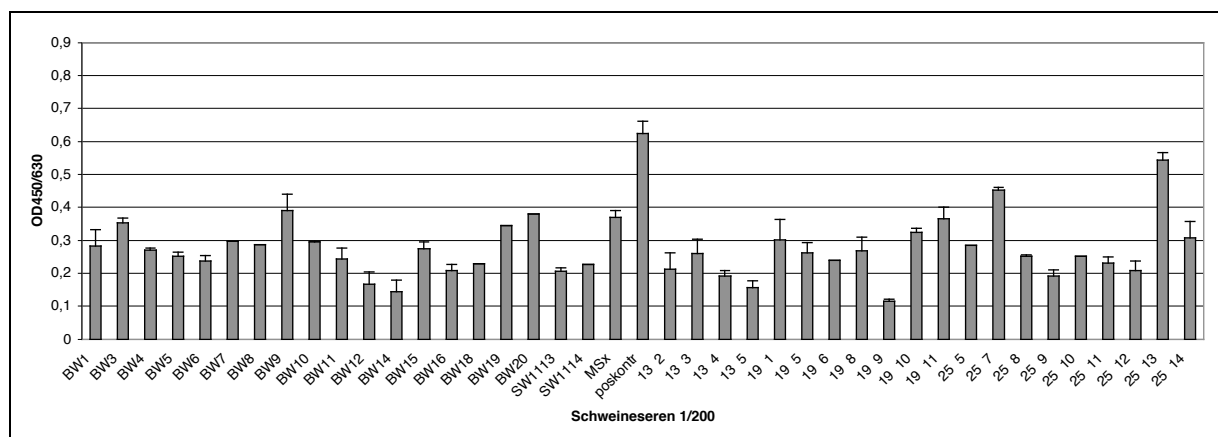
Der Mittelwert der Reaktion der *Sarcoptes*-positiven Humanseren mit dem Antigen von Klon Ss-4 lag bei  $OD_{450/630}$  0.559 ( $\pm$  0.133), während er für die Negativseren  $OD_{450/630}$  0.364 ( $\pm$  0.124) betrug (s. Abb. 37). Es bestanden signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Positiv- und der Negativseren ( $p < 0.001$ ). Die

Ergebnisse korrelierten mit den Werten, die mittels des ELISA bei Gebrauch des Gesamtantigens ermittelt wurden ( $r = 0.721$ ,  $p = 0.0$ ).

Der Mittelwert der positiven Schweineseren lag bei  $OD_{450/630}$   $0.29 (\pm 0.102)$  und der der Negativseren bei  $OD_{450/630}$   $0.27 (\pm 0.098)$  (s. Abb. 38). Hier konnte im Gegensatz zu den Humanseren keine signifikanten Differenzen zwischen den Ergebnissen der Positiv- und Negativseren ermittelt werden ( $p = 0.514$ ). Auch eine Korrelation zwischen diesen Werten und denen aus dem Sarcptes-ELISA 2001® (Afosa GmbH) existierte nicht ( $r = 0.276$ ,  $p = 0.084$ ).



**Abb. 37: ELISA mit einzelnen Humanseren und dem Antigen von Klon Ss-4.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcptes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.

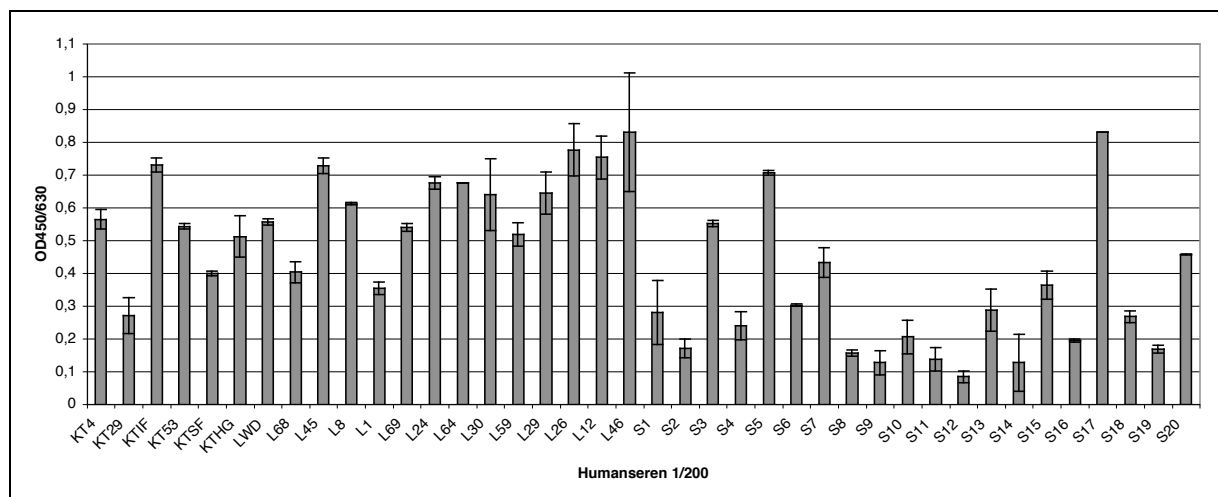


**Abb. 38: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen von Klon Ss-4.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.

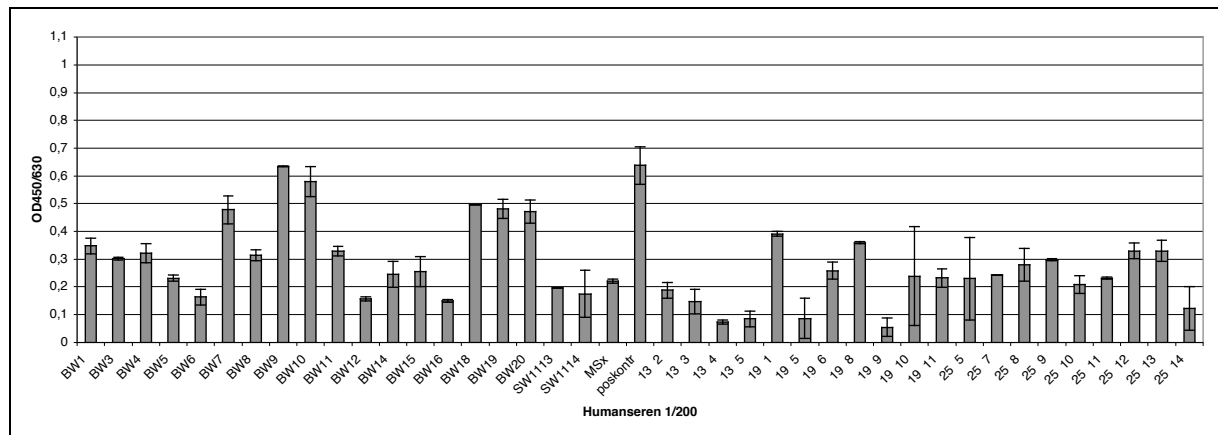
### 3.10.2 Klon Ss-7

Der Mittelwert der Reaktion der *Sarcoptes*-positiven Seren mit dem Antigen des Klon Ss-7 lag bei  $OD_{450/630}$  0.587 ( $\pm$  0.15), während er für die Negativseren  $OD_{450/630}$  0.305 ( $\pm$  0.201) betrug (s. Abb. 39). Für dieses Antigen bestanden signifikante Differenzen zwischen den Ergebnissen der Positiv- und der Negativseren ( $p < 0.001$ ). Die hier ermittelten Werten korrelierten mit denen aus dem ELISA mit Gesamtantigen ( $r = 0.438$ ,  $p = 0.005$ ).

Der Mittelwert der positiven Schweineseren belief sich auf  $OD_{450/630}$  0.342 ( $\pm$  0.159) während der der Negativseren  $OD_{450/630}$  0.219 ( $\pm$  0.099) betrug (s. Abb. 40). Signifikanten Differenzen zwischen den Werten der Positiv- und Negativseren lagen vor ( $p = 0.024$ ). Es bestand eine Korrelation zwischen diesen Werten und denen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) ( $r = 0.406$ ,  $p = 0.01$ ).



**Abb. 39: ELISA mit einzelnen Humansenen und dem Antigen von Klon Ss-7.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.



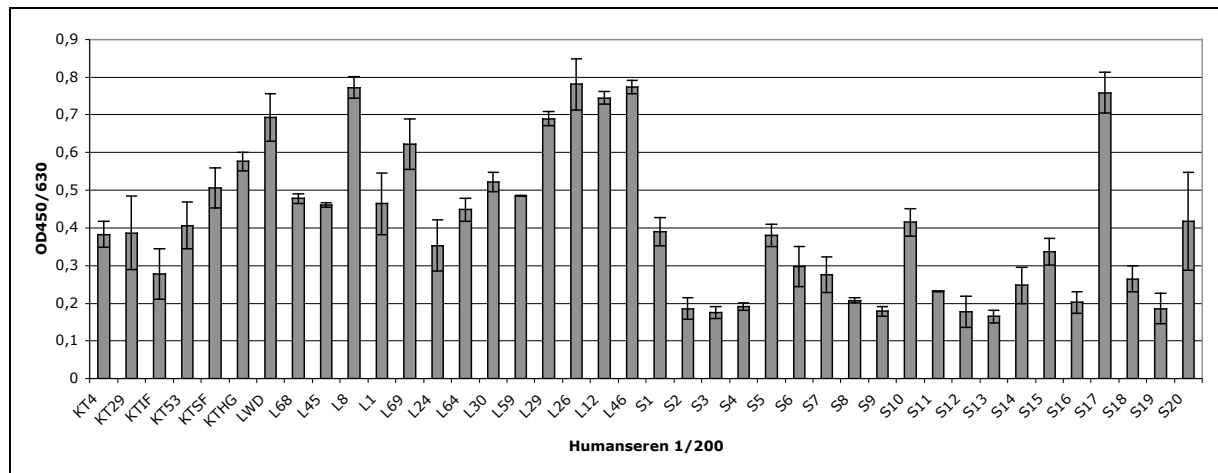
**Abb. 40: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen von Klon Ss-7.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontr sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.

### 3.10.3 Klon Ss-17

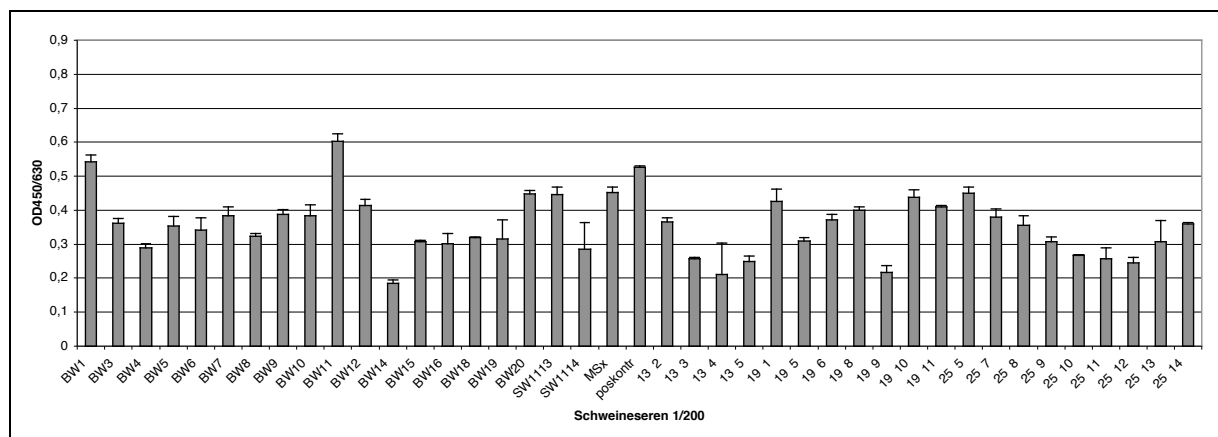
Der Mittelwert der Reaktion der *Sarcoptes*-positiven Humansenen mit dem Antigen von Klon Ss-17 lag bei OD<sub>450/630</sub> 0.541 ( $\pm$  0.156), während er für die Negativseren OD<sub>450/630</sub> 0.284 ( $\pm$  0.141) betrug (s. Abb. 41). Es bestanden signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Negativ- und der Positivseren ( $p = < 0.001$ ). Eine Korrelation zwischen diesen und den Werten aus dem ELISA mit Gesamtantigen konnte ermittelt werden ( $r = 0.789$ ,  $p = 0.0$ ).

Im Gegensatz dazu konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktionen der Räude-positiven und -negativen Schweineseren detektiert werden ( $p = 0.076$ ). Der Mittelwert der erkrankten Tiere betrug OD<sub>450/630</sub> 0.379 ( $\pm$  0.099), und der der gesunden Tiere belief sich auf OD<sub>450/630</sub> 0.329 ( $\pm$  0.076) (s. Abb. 42). Die Werte korrelierten mit den Ergebnissen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) ( $r = 0.488$ ,  $p = 0.0015$ ).





**Abb. 41: ELISA mit einzelnen Humansenen und dem Antigen von Klon Ss-17.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.



**Abb. 42: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen von Klon Ss-17.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.

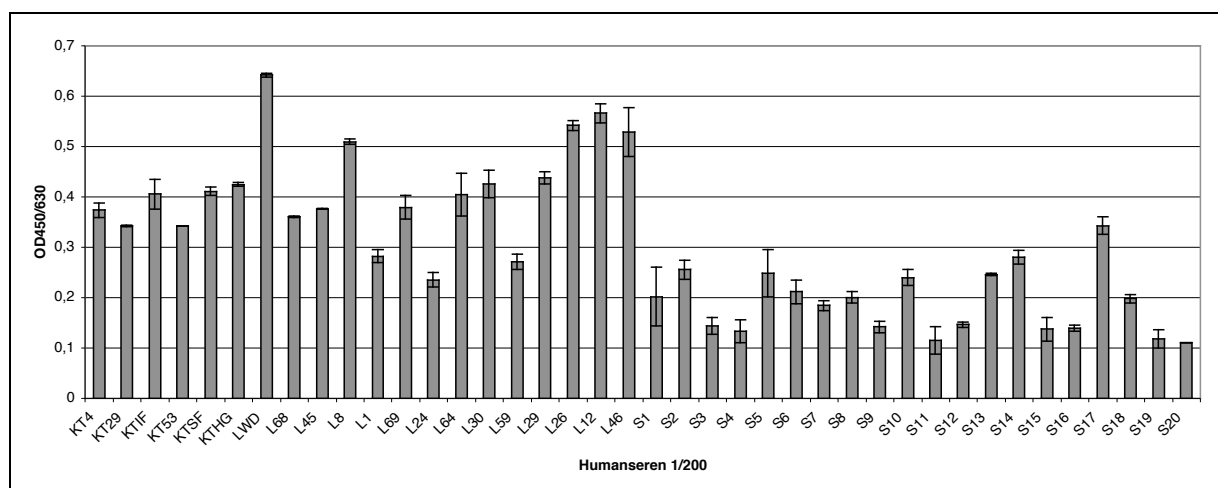
### 3.10.4 Klon Ss-18

Die mittlere Reaktivität der positiven Humansenen gegen das Fusionsprotein von Klon Ss-18/GST lag bei  $OD_{450/630}$  0.413 ( $\pm$  0.103), die der Negativseren hingegen betrug  $OD_{450/630}$  0.19 ( $\pm$  0.064) (s. Abb. 43). Zwischen den Werten der Positiv- und Negativseren waren signifikante Unterschiede zu verzeichnen ( $p = < 0.001$ ). Die Werte korrelierten mit den Ergebnissen aus dem ELISA mit Gesamtantigen ( $r = 0.487$ ,  $p = 0.001$ ). Wurde allerdings die Reaktion gegen reines GST von dieser Reaktion subtrahiert, zeigte sich, dass die Hintergrundreaktion gegen das GST derartig hoch

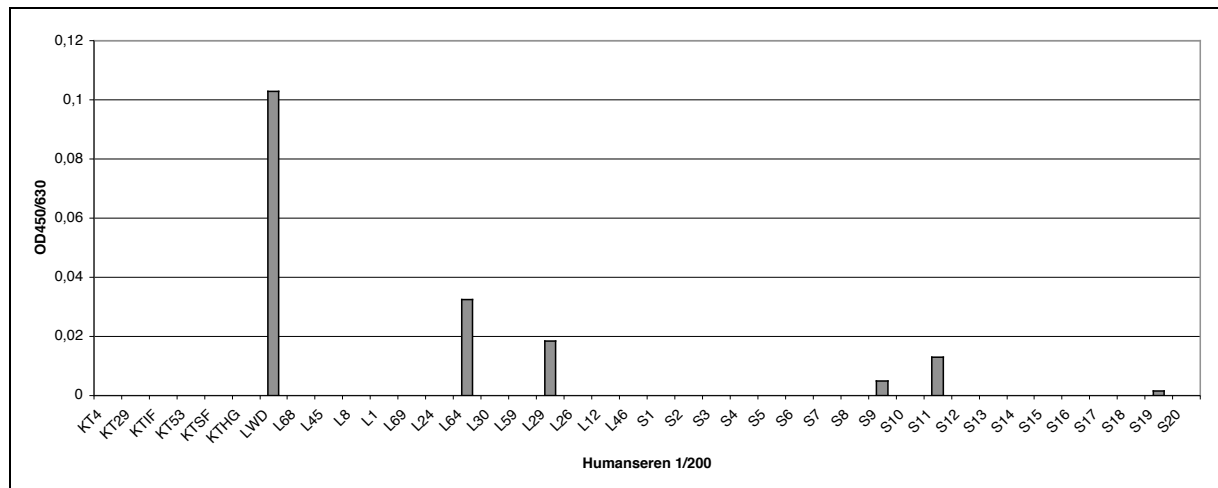
war, dass keine spezifische Reaktion mit dem rekombinanten *Ss-18* detektierbar war. Es konnte auch keine Korrelation zwischen den hier und denen aus dem ELISA mit Gesamtantigen ermittelten Werten detektiert werden ( $r = -0.018$ ,  $p = 0.91$ ).

Die Mittelwerte lagen hier bei  $OD_{450/630}$  0.008 ( $\pm 0.024$ ) für die Positiv- und bei  $OD_{450/630}$  0.001 ( $\pm 0.003$ ) für die Negativseren (s. Abb. 44). Es waren keinerlei signifikante Differenzen zu ermitteln ( $p = 0.913$ ).

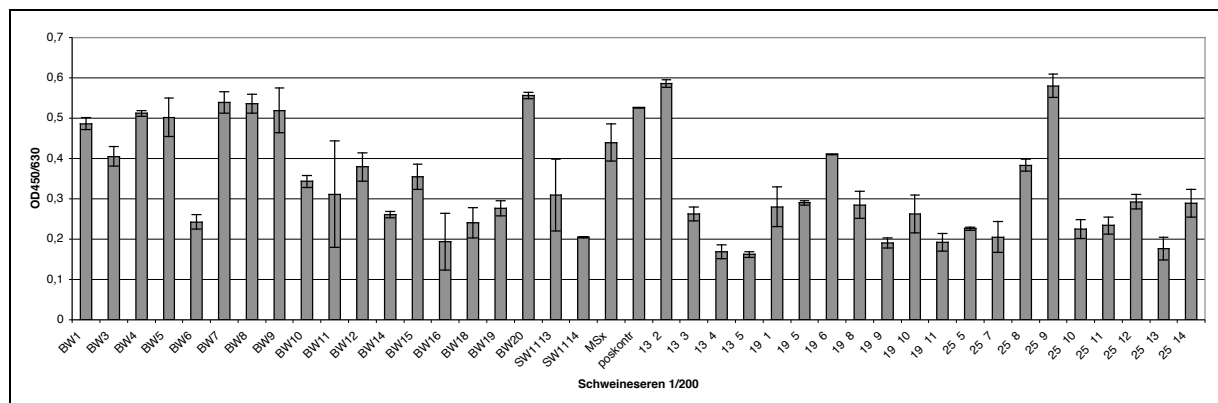
Der Mittelwert der Reaktivität der *Sarcoptes*-positiven Schweineseren gegen das Fusionsprotein des Klon *Ss-18*/GST betrug  $OD_{450/630}$  0.388 ( $\pm 0.124$ ). Der Mittelwert der Negativseren belief sich dagegen auf  $OD_{450/630}$  0.285 ( $\pm 0.121$ ) (s. Abb. 45). Es bestanden signifikante Differenzen zwischen den Werten der Positiv- und den der Negativseren ( $p = 0.011$ ). Auch eine Korrelation zwischen diesen Werten und denen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) existierte ( $r = 0.598$ ,  $p = 0.0$ ). Nach einer Subtraktion der Werte, die die jeweiligen Seren gegen reines GST-Protein gezeigt hatten, lag der Wert der Positivseren bei  $OD_{450/630}$  0.153 ( $\pm 0.12$ ) und der der Negativseren bei  $OD_{450/630}$  0.045 ( $\pm 0.094$ ) (s. Abb. 46). Auch hier waren signifikante Differenzen ( $p = < 0.001$ ) zwischen den Ergebnissen der Positiv- und Negativseren zu verzeichnen, und ebenso korrelierten die Werte mit denen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) ( $r = 0.669$ ,  $p = 0.0$ ).



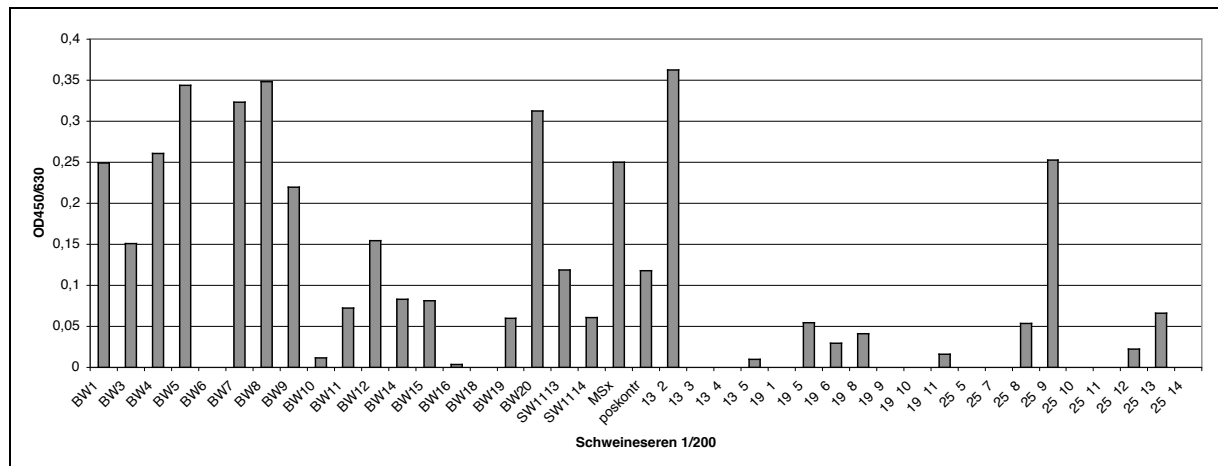
**Abb. 43: ELISA mit einzelnen Humansenen und dem Antigen von Klon *Ss-18*/GST als GST-Fusionsprotein.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.



**Abb. 44: ELISA mit einzelnen Humanseren und dem Antigen von Klon *Ss-18*/GST als GST-Fusionsprotein abzüglich der Reaktion gegen reines GST.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, die Seren S1 bis einschließlich S20 sind Seren gesunder Personen. Die Reaktion im ELISA gegen reines GST wurde von der Reaktion gegen das Fusionsprotein subtrahiert.



**Abb. 45: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen von Klon *Ss-18*/GST als GST-Fusionsprotein.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.



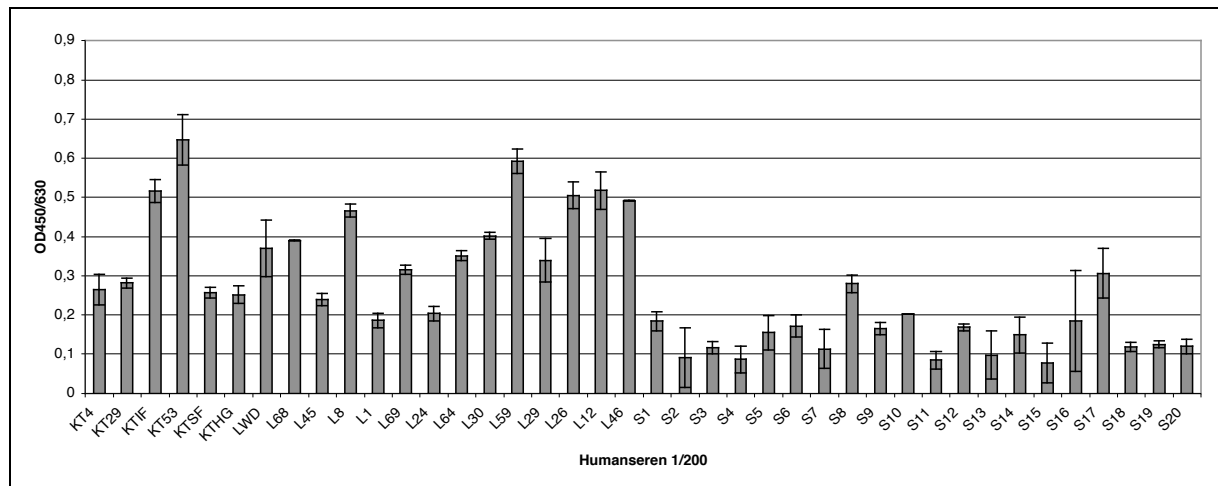
**Abb. 46: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen von Klon Ss-18/GST als GST-Fusionsprotein abzüglich der Reaktion gegen reines GST.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontr sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine. Die Reaktion im ELISA gegen reines GST wurde von der Reaktion gegen das Fusionsprotein subtrahiert.

Sowohl die Human- als auch die Schweineseren wurden mit GST präabsorbiert, um GST-spezifische Antikörper zu entfernen und damit unspezifische Reaktionen im ELISA zu verringern. Allerdings führte auch diese Präabsorption, wie die mit dem *E. coli*-Protein, zu keiner wesentlichen Verminderung der Hintergrundsreaktion.

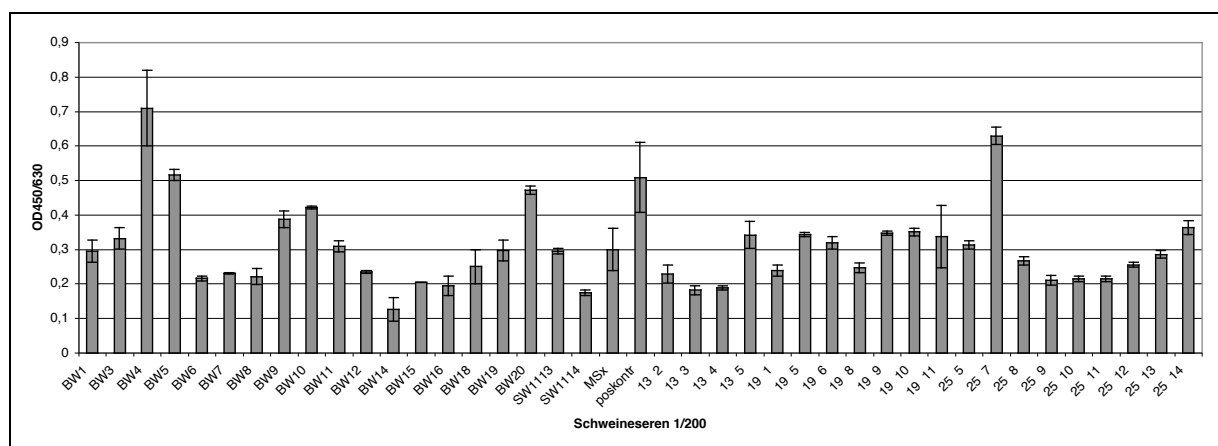
### 3.10.5 Klon Ss-23

Die mittlere Reaktivität der positiven Humanseren mit dem Antigen des Klons Ss-23 lag bei  $OD_{450/630}$  0.379 ( $\pm$  0.134), während die der negativen Seren  $OD_{450/630}$  0.15 ( $\pm$  0.062) betrug (s. Abb. 47). Auch hier bestanden signifikante Differenzen zwischen den Ergebnissen mit den Positiv- und den Negativseren ( $p = < 0.001$ ). Es konnte eine Korrelation zwischen diesen und den Ergebnissen im ELISA mit Gesamtantigen ermittelt werden ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.0$ ).

Der Mittelwert der Seren der *Sarcoptes*-infestierten Schweine betrug  $OD_{450/630}$  0.319 ( $\pm$  0.141); der Mittelwert der gesunden Tiere lag bei  $OD_{450/630}$  0.294 ( $\pm$  0.099) (s. Abb. 48). Auch hier waren für die Schweineseren keine signifikanten Differenzen zwischen den Positiv- und Negativseren zu ermitteln ( $p = 0.865$ ). Eine Korrelation zwischen diesen Ergebnissen und denen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) bestand nicht ( $r = 0.087$ ,  $p = 0.59$ ).



**Abb. 47: ELISA mit einzelnen Humansenen und dem Antigen des Klon *Ss-23*.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcophyes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.

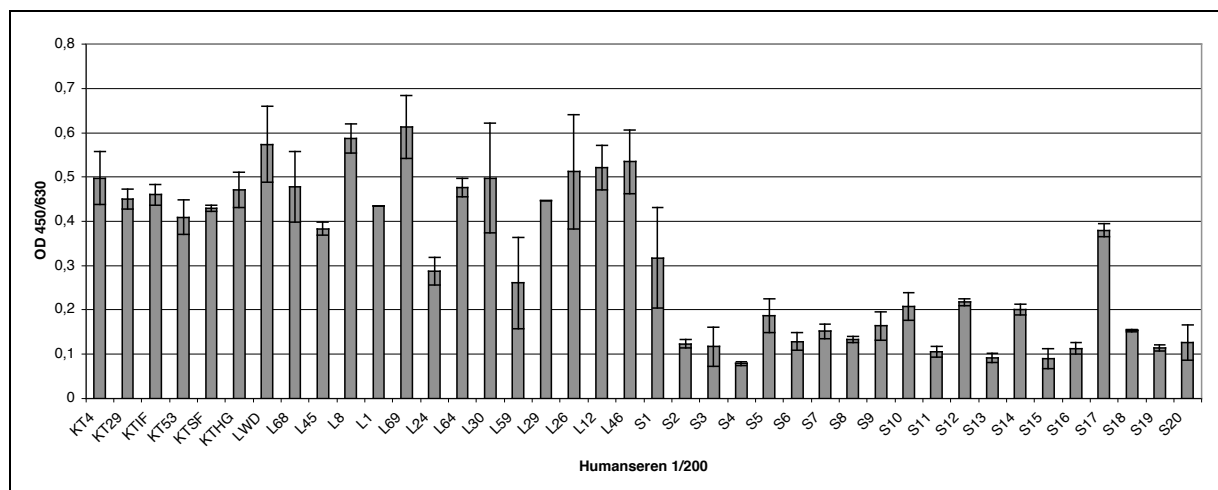


**Abb. 48: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen des Klon *Ss-23*.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcophyes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.

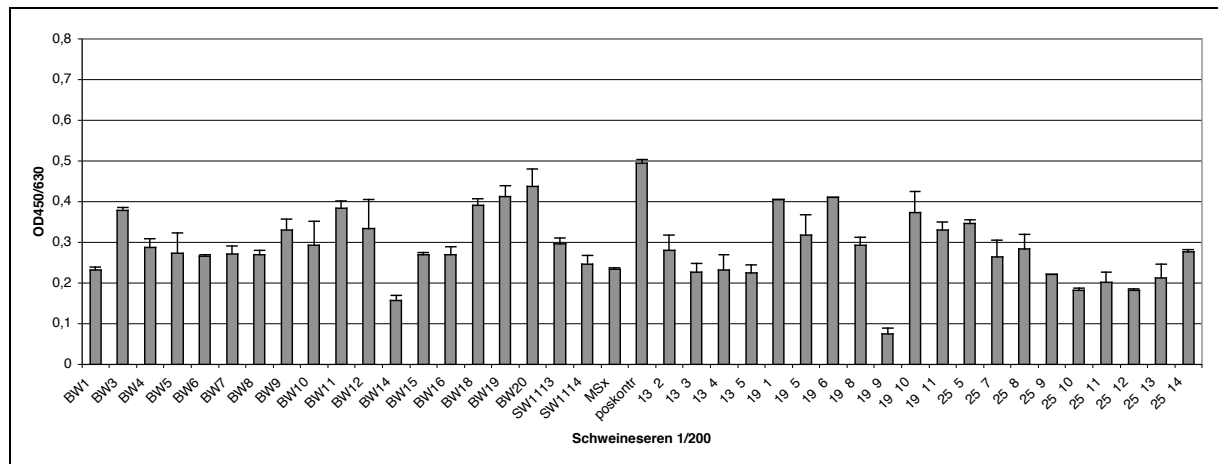
### 3.10.6 Klon Ss-37

Der Mittelwert der Reaktion der Skabies-positiven Patientenseren mit dem Antigen von Klon Ss-37 betrug  $OD_{450/630}$  0.466 ( $\pm$  0.088), wohingegen sich der der gesunden Patienten auf  $OD_{450/630}$  0.166 ( $\pm$  0.076) belief (s. Abb. 49). Signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Positiv- und der Negativseren bestanden ( $p = < 0.001$ ). Ebenso existierte eine Korrelation zwischen diesen Ergebnissen und denen aus dem ELISA mit Gesamtantigenen ( $r = 0.588$ ,  $p = 0.0$ ).

Die Ergebnisse mit den positiven Schweineseren ergaben einen Mittelwert von  $OD_{450/630}$  0.311 ( $\pm$  0.08), und die der negativen Seren einen Mittelwert von  $OD_{450/630}$  0.252 ( $\pm$  0.059) (s. Abb. 50). Es lagen signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Positiv- und Negativseren vor ( $p = 0.016$ ), und die Werte korrelierten mit denen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001<sup>®</sup> (Afosa GmbH) ( $r = 0.427$ ,  $p = 0.006$ ).



**Abb. 49: ELISA mit einzelnen Humansenen und dem Antigen des Klons Ss-37.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, bei den Seren S1 bis einschließlich S20 handelt es sich um Seren gesunder Personen.

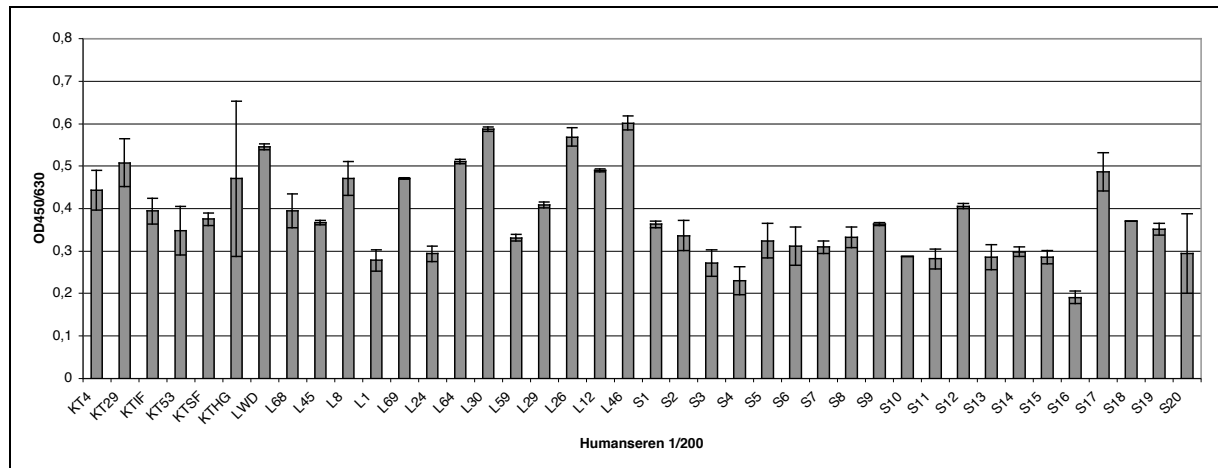


**Abb. 50: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen des Klon Ss-37.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.

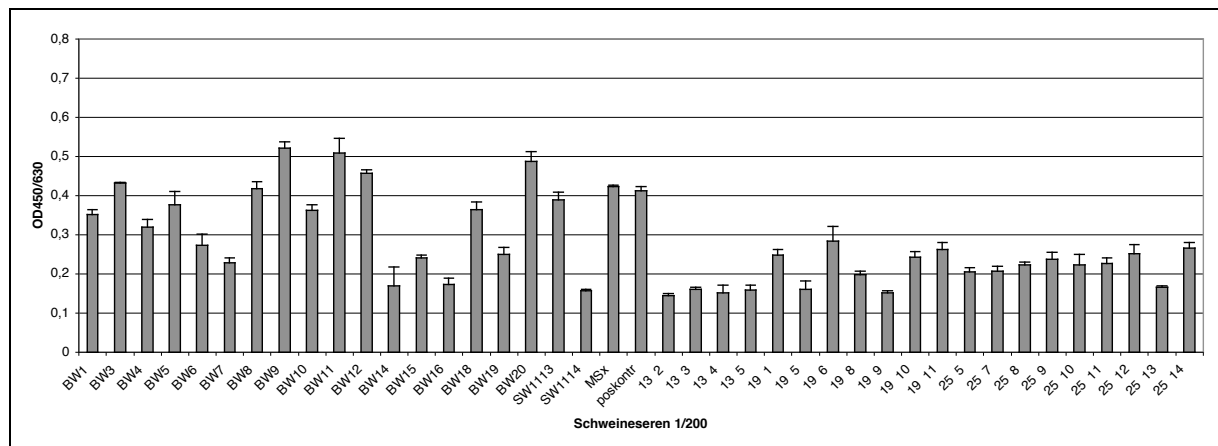
### 3.10.7 Klon Ss-97

Die mittlere Reaktivität der *Sarcoptes*-positiven Patientenseren betrug  $OD_{450/630}$  0.443 ( $\pm 0.095$ ), wohingegen sich die der Seren von den gesunden Patienten auf  $OD_{450/630}$  0.319 ( $\pm 0.063$ ) belief (s. Abb. 51). Es bestanden signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen der Positiv- und der Negativseren ( $p = < 0.001$ ). Eine Korrelation zwischen diesen Werten und denen aus dem ELISA mit Gesamtantigen war ebenfalls detektierbar ( $r = 0.517$ ,  $p = 0.0$ ).

Der Mittelwert der Seren der *Sarcoptes*-infestierten Schweine betrug  $OD_{450/630}$  0.348 ( $\pm 0.112$ ). Der Mittelwert der gesunden Tiere lag bei  $OD_{450/630}$  0.208 ( $\pm 0.045$ ) (s. Abb. 52). Auch für die Schweineseren waren signifikante Differenzen zwischen den Positiv- und Negativseren zu verzeichnen ( $p = < 0.001$ ). Eine Korrelation zwischen diesen und den Ergebnissen aus dem *Sarcoptes*-ELISA 2001® (Afosa GmbH) bestand ( $r = 0.671$ ,  $p = 0.0$ ).



**Abb. 51: ELISA mit einzelnen Humanseren und dem Antigen des Klon *Ss-97*.** Die Seren KT4 bis einschließlich L46 sind Seren *Sarcoptes*-positiver Patienten, die Seren S1 bis einschließlich S20 sind Seren gesunder Personen.



**Abb. 52: ELISA mit einzelnen Schweineseren und dem Antigen des Klon *Ss-97*.** Die Seren BW1 bis einschließlich poskontrol sind Seren *Sarcoptes*-positiver Schweine, die Seren 13 2 bis einschließlich 25 14 sind Seren gesunder Schweine.



Für eine Übersicht sind die Ergebnisse aus den ELISAs mit den rekombinanten Antigenen und den verschiedenen Seren in Tab. 6 dargestellt.

**Tab. 6: Übersicht der Ergebnisse aus den ELISAs mit den rekombinanten Antigenen. A:** ELISA mit Humansenen **B:** ELISA mit Schweineseren

**A**

Klon	OD <sub>450/630</sub>		signifikante Differenzen	Korrelation zu ELISA mit SsGesamtantigen
	Humansenen positiv	negativ		
<i>Ss-4</i>	0.559	0.364	ja (p< 0.001)	ja (r=0.721, p=0.0)
<i>Ss-7</i>	0.587	0.305	ja (p<0.001)	ja (r= 0.438, p=0.005)
<i>Ss-17</i>	0.541	0.284	ja (p<0.001)	ja (r= 0.789, p=0.0)
<i>Ss-18/GST</i>	0.413	0.19	ja (p<0.001)	ja (r= 0.487, p=0.001)
<i>Ss-18/GST</i> substr. GST	0.008	0.001	nein (p=0.913)	nein (r=-0.018, p=0.91)
<i>Ss-23</i>	0.379	0.15	ja (p<0.001)	ja (r= 0.57, p=0.0)
<i>Ss-37</i>	0.466	0.166	ja (p<0.001)	ja (r= 0.588, p=0.0)
<i>Ss-97</i>	0.443	0.319	ja (p<0.001)	ja (r= 0.517, p=0.0)

**B**

Klon	OD <sub>450/630</sub>		signifikante Differenzen	Korrelation zu ELISA mit SsGesamtantigen
	Schweineseren positiv	negativ		
<i>Ss-4</i>	0.29	0.27	nein (p=0.514)	nein (r=0.276, p=0.084)
<i>Ss-7</i>	0.342	0.219	ja (p=0.024)	ja (r=0.406, p=0.01)
<i>Ss-17</i>	0.379	0.329	nein (p=0.076)	ja (r=0.488, p=0.0015)
<i>Ss-18/GST</i>	0.388	0.285	ja (p=0.011)	ja (r=0.598, p=0.0)
<i>Ss-18/GST</i> substr. GST	0.153	0.045	ja (p<0.001)	ja (r=0.669, p=0.0)
<i>Ss-23</i>	0.319	0.294	nein (p=0.865)	nein (r=0.087, p=0.59)
<i>Ss-37</i>	0.311	0.252	ja (p=0.016)	ja (r=0.427, p=0.006)
<i>Ss-97</i>	0.348	0.208	ja (p<0.001)	ja (r=0.671, p=0.0)

## 4 Diskussion

Eine *Sarcoptes*-Infektion zeichnet sich in der Mehrheit der Fälle durch das Auftreten geringer Milbenanzahlen auf dem Wirt aus. Allerdings können schon wenige Milben die typische Skabies- bzw. Räudesymptomatik auslösen. Liegt der Verdacht auf eine Infektion mit den Milben vor, kann es daher schwierig sein, einen direkten *Sarcoptes*-Nachweis zu erbringen. In der jüngsten Vergangenheit wurden diverse serologische Tests entwickelt, in denen Gesamtextrakt der Milben als Antigen verwendet wird. Problematisch ist hier zunächst, dass oft Kreuzreaktionen auftreten, die keine eindeutige Diagnose der *Sarcoptes*-Infektion zulassen. Der wesentliche Nachteil in diesem System besteht allerdings in der Notwendigkeit einer Stammhaltung der Milben auf einem geeigneten Wirt. Dabei handelt es sich um ein verhältnismäßig kostspieliges und anfälliges Verfahren, das belastend für das Wirtstier ist. In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll, ein System zu entwickeln, in dem geeignete rekombinante Antigene ohne großen materiellen und zeitlichen Aufwand synthetisiert werden können. Ziel dieser Arbeit war es, derartige Antigene zu finden, die hochspezifisch für *S. scabiei* sind, und anhand derer eine Skabies- bzw. Räude-Infektion zuverlässig detektiert werden kann. Es sollten die Voraussetzungen für einen serologischen Test geschaffen werden.

### 4.1 Parasitenmaterial

Auf Grund der schlechten Verfügbarkeit von *S. scabiei* var. *hominis*-Milben, wurde in dieser Arbeit die Milbenvarietät vom Schwein verwendet. Die Isolierung der Klone sowie Teile der weiteren serologischen Untersuchungen wurden allerdings anhand von humanen Seren unternommen. Immunologische Studien haben ergeben, dass die *S. scabiei*-Varietäten *suis*, *canis* und *hominis* dem Wirt einige gleiche Antigene präsentieren und daher in immunologischer Hinsicht verwandt sind. Trotzdem wurden auch unterschiedliche Reaktionen der verschiedenen Wirte gegen Varietätsspezifische Epitope in gleichen oder unterschiedlichen Molekülen beobachtet (Arlian et al. 1996a). In dieser Arbeit wurden Antigene gesucht, die in erster Linie der Diagnose der Skabies beim Menschen dienen sollten. Auf Grund der Tatsache, dass diese Antigene aber auch auf ihre potenzielle Eignung in der Räudediagnostik

beim Tier getestet werden sollten, war die Verwendung der Schweinemilben als Ausgangsmaterial durchaus akzeptabel.

## 4.2 Reaktion der Patientenseren mit SsGesamtantigen

Es konnte gezeigt werden, dass die IgG-Antikörperantwort von Skabies-Patienten unabhängig von einer Glykosilierung des Milben-Proteins ist. Das Gesamtantigen von *S. scabiei* wurde mittels einer Natriumperjodatbehandlung deglykosiliert und im ELISA eingesetzt. Die Reaktion der Skabies-positiven Seren mit dem Antigen wurde durch die Deglykosilierung nicht herabgesetzt. In der Literatur existieren keine vergleichbaren Untersuchungen an parasitischen Arthropoden, die das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis bestätigen können, das Gegenteil ist der Fall. Tellam et al. (2001) unternahmen vergleichende Vakzinierungsstudien mit dem nativen und rekombinant in *E. coli* bzw. *Sf9* Zellen hergestelltem Peritrophin-95, einem larvalen Glykoprotein von *Lucilia cuprina*. Sie kamen zu dem Schluss, dass u. a. die Oligosaccharide des nativen Proteins für die Induktion der Aktivität der Larvenentwicklungshemmung im Serum von vakzinierten Schafen verantwortlich sind. Diese Aktivität war mit IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2</sub>,- nicht aber mit IgM-Antikörpern assoziiert. Auch Studien an anderen Parasiten ergeben ähnlich Ergebnisse: In Untersuchungen an Patienten mit Helmintheninfektionen konnte gezeigt werden, dass die Th-2-Antwort des Wirtes abhängig von der Glykosilierung der Parasitenproteine ist (Okano et al. 1999, Tawill et al. 2004). Sommer et al. (2001) fanden in Onchozerkose-Patienten im Vergleich zu dem nativen OvGST eine signifikant verringerte Reaktion gegen das deglykosilierte- bzw. in *E. coli* exprimierte OvGST.

Gleichzeitig berichten Oleaga-Perez et al. (1994), dass falsch positive Ergebnisse bei einer Diagnose von *Ornithodoros erraticus* durch Reaktionen mit Zuckerepitopen des löslichen Speicheldrüsenextraktes (*SGE-2*) zustande kommen. Bei einer Deglykosilierung des Antigens wurde die Spezifität wesentlich erhöht, so dass keine falsch positiven Ergebnisse mehr auftraten. Auch Lorenzo et al. (2000) fanden nach einer O-Deglykosilierung eine erhöhte Spezifität des Antigens *UA3R* von *Anisakis simplex*. In dieser Arbeit ist die Antikörperreaktion mit dem deglykosilierten Protein im Vergleich zum der mit dem glykosilierten tendenziell leicht erhöht (s. Abb. 4). Diese

leicht erhöhte Reaktion mit dem deglykosilierten Protein könnte durch eine spezifischere Bindung an das reine Protein bedingt sein, da die Epitope nicht durch Zuckergruppen verdeckt und so besser zugänglich für die Antikörper sind.

Die Hintergrundsreaktionen im ELISA mit SsGesamtantigenen sind hier nicht auf die Glykosylierung zurückzuführen, da die Reaktion mit dem Negativserum nicht durch die Deglykosylierung beeinflusst wird. Diese Hintergrundsreaktion kann andere Gründe haben: Die freilebenden Hausstaubmilben, die in naher Verwandtschaft zu den *Sarcoptes*-Milben (Astigmata) stehen, sind weit verbreitet (Arlian et al. 1992). Immunisierungen von Kaninchen mit Extrakten von *D. farinae* und *D. pteronyssinus* (Arlian et al. 1995) führten zu einer Reduktion der Parasitenbürde bei nachfolgenden *Sarcoptes*-Infektionen. Antigene bzw. Epitope dieser freilebenden Milben können demnach den Wirt gegen *Sarcoptes*-Milben sensibilisieren und eine protektive Immunität gegen *Sarcoptes*-Infektionen induzieren. Mit *Sarcoptes*-Milben infizierte Hunde zeigten erhöhte Antikörperreaktionen gegen Hausstaubmilbenantigen, als vor der Infektion (Arlian et al. 2000). Seren von *Sarcoptes*-infestierten Kaninchen enthielten Antikörper, die mit diversen Antigenen in Extrakten von *D. farinae* und *D. pteronyssinus* reagierten. Umgekehrt präzipitierten Antikörper, die gegen *D. farinae* und *D. pteronyssinus* gerichtet waren, in der Kreuzimmunelektrophorese (CIE) Proteine in *Sarcoptes*-Extrakten (Übersicht Arlian 1996). Molekularbiologische Studien haben Homologien zwischen Antigenen der *Sarcoptes*- und Hausstaubmilben ergeben (Ljunggren et al. 2003, Holt et al. 2003, Fischer et al. 2003, Harumal et al. 2003). Auf Grund der permanenten Konfrontation des Menschen mit Hausstaubmilbenantigenen muss also bei einer Serodiagnose anhand von Gesamtantigenen mit Kreuzreaktionen gerechnet werden, die die spezifische Diagnose einer *Sarcoptes*-Infektion erschweren.

Die Ergebnisse aus dem ELISA mit SsGesamtantigenen unter Verwendung der Humansenen korrelierten nicht mit den Ergebnissen, die von der Afosa GmbH ermittelt wurden. Die Ursache für die fehlende Korrelation liegt vermutlich darin, dass der hier durchgeführte Test unter anderen Bedingungen, als bei der Afosa GmbH, durchgeführt wurde. Die Werte der Firma waren unter Verwendung des *Sarcoptes*-ELISA 2001® ermittelt worden. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten ELISA stand

kein Kontrollserum, um dessen Wert die Ergebnisse hätten korrigiert werden, zur Verfügung. Des Weiteren können unterschiedliche Blockierungsmedien zu abweichenden Ergebnissen führen (persönliche Mitteilung Dr. H.-F. Matthes). Hier führten große Abweichungen bei einzelnen Seren zu den fehlenden Korrelationen. Hohe unspezifische Hintergrundsreaktionen trugen ebenfalls zu den abweichenden Ergebnissen bei.

Die im Anschluss an die Humanseren verwendeten Schweineseren zeigten in dem ELISA mit SsGesamtantigen spezifische Reaktionen ohne Hintergrund. Bei dem ELISA, der hier verwendet wurde, handelte es sich ebenfalls um den für die Räude-Diagnostik beim Schwein etablierten, der sich in Vergleichen mit anderen durch eine hohe Sensitivität auszeichnete (Kessler et al. 2003, Löwenstein et al. 2004). Hintergrundsreaktionen sind hier durch die Optimierung des Tests in geringeren Maßen als bei einem nicht kommerziellen Test zu erwarten. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass das Schwein auf Grund seiner kürzeren Lebensdauer einer geringeren Anzahl von Antigenen ausgesetzt ist, als es der Mensch im Laufe seines Lebens ist. Allein auf Grund dieser Tatsache muss beim Menschen mit höheren Kreuzreaktionen bei einer serologischen *Sarcoptes*-Diagnostik gerechnet werden.

### **4.3 RNA-Isolierung und Klone aus der cDNA-Bank**

Im Allgemeinen ist zu erwarten, dass in einer Genbank, die aus Parasitenmaterial hergestellt wird, Kontaminationen durch Wirts-RNA auftreten (Harumural et al. 2003, Fischer et al. 2003). Durch den Sequenzenabgleich der isolierten Klone mit denen aus der öffentlichen Datenbank wurden in der hier verwendeten cDNA-Bank keine kontaminierenden cDNA-Sequenzen vom Schwein gefunden. Zunächst handelte es sich bei den Milben um hochreines Parasitenmaterial, das durch das Auswandern der Parasiten aus der Haut gewonnen worden war. So kann davon ausgegangen werden konnte, dass sich nur wenige Kontaminanten, verursacht z. B. durch Hautrückstände des Wirtes auf der Milbenoberfläche oder im Milbendarm, in der cDNA-Bank befanden. Ein viel wesentlicherer Aspekt ist aber die Tatsache, dass alle hier charakterisierten Klone durch eine Antikörperreaktion mit dem Serum Skabies-

positiver Patienten gefunden wurden. Unter diesen Umständen konnten eventuelle Kontaminationen durch Wirts-RNA schwerlich detektiert werden.

Ein Problem bei der Interpretation der Sequenzdaten lag in den Eigenschaften des exprimierenden Vektors  $\lambda$ TriplEx2, in dem die cDNA-Bank konstruiert wurde.

Der  $\lambda$ -Phage TriplEx2 zeichnet sich durch das Vorhandensein von zwei Start-Codons in unterschiedlichen Leserahmen und einen Bereich von 13 Thymidinen zwischen dem zweiten Start-Codon und der MCS aus. Dieser Bereich ermöglicht der RNA-Polymerase ein Gleiten und damit das Auslassen von Nukleotiden während der Transkription. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass die klonierten Sequenzen in allen drei Leserahmen exprimiert werden, so dass theoretisch jeder rekombinante Phage in der cDNA-Bank ein Protein produziert. In manchen Fällen war es allerdings nach der Sequenzierung der Insertionen schwierig zu entscheiden, in welchem Leserahmen das Protein exprimiert wurde. Dies war insbesondere der Fall, wenn innerhalb der klonierten Sequenz zunächst sequenzeigene Start-Codons auftraten, auf die dann Stop-Codons sowie weitere, stromabwärts liegende Start-Codons folgten (*Ss-17*, *Ss-23* und *Ss-97*). In der Mehrheit der Fälle wird in einem Transkript das erste Start-Codon von der RNA-Polymerase genutzt. Allerdings gibt es Ausnahmen, in denen weiter stromabwärts gelegene Methionine als Translationsstart dienen, z. B. wenn die Sequenzumgebung des Start-Codons nicht optimal ist. Auf diese Weise können die Transkripte, die von dem stromabwärts gelegenen Start-Codon gebildet werden, auf einem quantitativ geringen Niveau gehalten werden (Übersicht Mignone et al. 2002). In den Plasmid- bzw. Phagenklonen lag das erste Start-Codon innerhalb des Vektors. Alle Sequenzen der Insertionen wurden mit den Proteinsequenzen aus öffentlichen Datenbanken abgeglichen (BLASTX). Die Homologien aus dem Datenbankabgleich zu bekannten Proteinen in einem bestimmten Leserahmen sowie der Ausschluss der jeweiligen zwei anderen Leserahmen führten dazu, dass in einigen Fällen der Leserahmen, in dem das Start-Codon auf ein oder mehrere Stop-Codons folgte, für die Genexpression gewählt wurde. Bei diesen Klonen wurde davon ausgegangen, dass die RNA-Polymerase nicht das Start-Codon des Vektors, sondern das ermittelte, innerhalb der klonierten Sequenz genutzt hatte. Auf diese Weise konnten die Klone *Ss-17*, *Ss-23* und *Ss-97* exprimiert und das rekombinante Protein aufgereinigt

werden. In den Klonen, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, ist der offene Leserahmen eindeutig. In der dargestellten Aminosäuresequenz treten, im Gegensatz zu den beiden anderen Leserahmen, weder Stop-Codons am N-Terminus noch in der zentralen Region des Proteins auf.

Einige der sequenzierten Klone weisen kein Stop-Codon auf, obwohl die mRNA über den Poly-A-Anhang aus der Gesamt-RNA selektiert wurde. Dies ist bei den meisten der für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klonen sowie den Sequenzen der Klone Ss-7, Ss-23 und Ss-97 zu beobachten. Es ist möglich, dass die betreffenden Klone eine Adenin reiche Region im 3'-Bereich enthalten, anhand derer die mRNA fälschlicherweise bei der Poly-T-Aufreinigung isoliert wurde. Aus diesem Grund könnte es sich bei diesen Klonen um Sequenzen handeln, deren 3'-Enden unvollständig sind. Der Klon Ss-7, der weder ein Start- noch ein Stop-Codon enthält, weist eine Homologie zu einem Titin von *D. melanogaster* auf (Acc. No.: DAA00021). Bei diesem Protein handelt es sich um ein Protein der Größe von etwa 2034 kDa, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei dem in dieser Arbeit isolierten Klon lediglich um ein Proteinfragment handelt. Fehlende Start-Codons, wie z. B. bei einigen repetitiven Klonen, können durch eine unvollständige Reaktion der Reversen Transkriptase bedingt sein (Wellenreuther et al. 2004). Allerdings war es für diese Arbeit nicht relevant, vollständig Gene zu erhalten, sondern die Fragmente zu isolieren, die Epitope enthielten. Dies war auf dem Weg des Immunoscreenings erfolgt.

#### 4.4 Expression der rekombinanten Antigene

Die Auswahl *Sarcoptes*-spezifischer Antigene sollte zunächst über ein relativ einfaches Auswahlverfahren erfolgen, in dem die exprimierten Klone in Form von Lysaten infizierter *E. coli*-Bakterien im Dot Blot parallel mit Skabies-positiven und -negativen Seren getestet werden sollten (Bradley et al. 1991). Auf diese Weise hätten alle Klone parallel auf ihre Spezifität für *Sarcoptes* getestet werden können, so dass ein geringer Zeit- und Arbeitsaufwand nötig gewesen wäre. Allerdings traten hier starke Hintergrundreaktionen, vermutlich durch Antikörperreaktionen mit *E. coli*-Protein hervorgerufen, auf, so dass eine eindeutig positive bzw. negative Reaktion der Klone nicht ermittelbar war. So wurde mit allen Klonen eine *in vivo*-Exzision durchgeführt und die cDNA in dem Plasmid pTriplEx2 standardmäßig mit 1 mM IPTG exprimiert. Das Gesamtprotein wurde im Anschluss im SDS-Gel nach Größe aufgetrennt. Auf diese Weise konnten zusätzliche Banden, die nach Induktion auftraten, identifiziert und die Reaktion mit dem Serum eindeutig zugeordnet werden. Die Expressionsbedingungen sind nicht für alle Gene gleich, und die Bedingungen in dem Plasmid waren nicht dieselben, wie die während des Immunoscreenings, in dem die Gene in dem Phagen exprimiert wurden. So war es nicht verwunderlich, dass unter diesen Standardbedingungen nicht alle rekombinanten Antigene exprimiert wurden. Eine Bestimmung der *Sarcoptes*-Spezifität dieser Antigene war auf Grund der unterbliebenden Expression nicht möglich. So wurden alle bis dahin unbekannten Klone, die im Immunoscreening eine verhältnismäßig starke Reaktion mit dem Skabies-positiven Serum gezeigt hatten, und für die die DNA-Hybridisierung keine Sequenz ergeben hatte, die für „KE-reiches Antigen“ kodiert, sequenziert. Die Klone, die die stärkste Reaktion gezeigt hatten, versprachen ein höheres Potenzial für die Immundiagnostik als die schwächer reagierenden. Diese Klone wurden dann für eine Expression der Gene in Expressionsvektoren kloniert und die Bestimmung der Spezifität für *Sarcoptes* erfolgte erst nach der Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Der gewählte Weg der *in vivo*-Exzision und der Expression der Klone in Flüssigkultur war zwar erheblich zeit- und arbeitsaufwändiger als der des Dot Blots (s.o), allerdings wurden durch die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und anschließendem Western Blot die Probleme mit unspezifischen Hintergrundreaktionen mit *E. coli*-Protein umgangen. Durch die nachfolgende



Sequenzierung der stark immunreaktiven, in dem exzisierten System nicht exprimierenden Klone, konnte der Verlust von potenziellen Diagnostik-Kandidaten vermieden werden.

Von den neun ausgewählten rekombinanten Antigenen konnten sieben erfolgreich in Expressionsvektoren kloniert und exprimiert werden, und das Protein konnte aufgereinigt werden. Abgesehen von dem Protein des Klons *Ss-18* wurden alle Antigene als einzelne Polypeptide in dem System pQE-30-32 exprimiert. Eine Expression des Klons *Ss-18* war nur als Fusionsprotein mit GST in dem System pET-41 möglich. Bei zwei Klonen (*Ss-14* und *Ss-134*) konnte eine Expression nicht erreicht werden, obwohl verschiedene Expressionszeiten und -temperaturen sowie unterschiedliche IPTG-Konzentrationen getestet wurden. Auch durch die Klonierung als GST-Fusionsgene konnte keine Expression erzielt werden. Die Gründe für eine nicht detektierbare Überexpression rekombinanter Proteine können in der Toxizität des Proteins oder in dessen proteolytischen Abbau liegen (Lottspeich und Zorbas 1998). So könnte hier die Klonierung in z. B. ein System, in dem im Cytoplasma toxische Proteine in das Periplasma sezerniert werden, zu einer erfolgreichen Überexpression führen.

Das rekombinante Fusionsprotein des Klons *Ss-18* weist im SDS-Gel ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa auf. Das reine GST hat ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa, was bedeutet, dass das rekombinante *Sarcoptes*-Protein ein apparentes Molekulargewicht von etwa 45 kDa hat, während das errechnete bei 27 kDa liegt. Aus Abb. 7 wird ersichtlich, dass sowohl das exprimierte Protein von Klon *Ss-14* (errechnet 40.3 kDa, apparent etwa 62 kDa) als auch das von Klon *Ss-18* in dem Plasmid pTriplEx2 ebenfalls größer als errechnet sind. Bei Proteinen, die sich aus vielen polaren Aminosäuren zusammensetzen, ist das tatsächliche Gewicht oft ein anderes als das errechnete (Ramachandran et al. 1998). Vermutlich ist dies auf die vielen Wiederholungen der stark polaren Domänen, bestehend aus den Aminosäuren Glutamat und Lysin, zurückzuführen. Das apparente Gewicht des Proteins von Klon *Ss-97* hingegen ist mit 19 kDa anstelle von 29.3 kDa geringer als das errechnete, obwohl auch hier der Anteil der polaren Aminosäure Glutamat (13.08%) verhältnismäßig hoch ist. Allerdings ist der prozentuale Anteil der unpolaren Aminosäure Glycin (36.34%) wesentlich höher. Es ist nicht zu erwarten, dass das

Protein am C-Terminus unvollständig exprimiert wurde, da im Gel keine Degradationsprodukte zu sehen sind (s. Abb. 23). Allerdings könnten Start-Codons, die in der Sequenz auftreten, für einen internen Translationsstart verantwortlich sein, so dass das exprimierte Protein am N-Terminus verkürzt ist.

Das Protein des Klons *Ss-7* weist im SDS-Gel ein wesentlich größeres Molekulargewicht auf, als das errechnete. Auf Grund der Tatsache, dass es doppelt so groß ist (62 kDa anstelle von 27.3 kDa), ist es wahrscheinlich, dass das Protein hier als Dimer vorliegt.

#### 4.5 Antigenität und potenzielle Funktionen der isolierten Antigene

Auf der Suche nach parasitenspezifischen Antigenen für eine Serodiagnose von *Onchocerca* ssp. haben einige Autoren Antigene gefunden, denen ein geringes Molekulargewicht (< 31 kDa) gemein war (Gallin et al. 1989, Lobos et al. 1990, Bradley et al. 1991, Cho-Ngwa et al. 2003). Auch bei anderen Nematoden, wie z. B. *Cooperia oncophora* (de Graaf et al. 1993, Nieuwland et al. 1995) und *Dictyocaulus viviparus* (Schnieder 1992) wurden kleinere Proteine durch das Serum infizierter Tiere erkannt. Bei kleineren Proteinen sind im Vergleich zu den größeren weniger Epitope vorhanden, die kreuzreagieren können, so dass im Allgemeinen von diesen Molekülen eine höhere Spezifität als von den größeren zu erwarten ist. Auch bei den in dieser Arbeit isolierten immunreaktiven Klonen, die exprimiert wurden, ist eine Tendenz zu kleineren Molekülen ersichtlich. Diese Klone umfassen ein Größenspektrum, bei dem es sich um Proteine der Größen zwischen etwa 20 kDa bis 45 kDa handelt. Allerdings können keine detaillierten Aussagen über die Spezifität dieser Antigene gemacht werden, da sie zu diesem Zweck mit den Seren von Hausstaubmilbenallergikern und Patienten, die mit anderen Ektoparasiten infiziert sind, getestet werden müssten.

Es wurden auch Klone isoliert, die ein Insert trugen, deren Basenpaarlänge auf ein größeres Protein schließen ließ. Allerdings wurden diese Klone nicht sequenziert, und so kann auch keine Aussage über die Größe des Proteins gemacht werden, da weder die Position des Translationsstarts noch die des Translationsendes bekannt sind.

Die Klone *Ss-17*, *-23*, *-97*, sowie die für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klone beinhalten eine Signalsequenz. In Klon *Ss-37* fehlt der 5'-Bereich, aber der Datenbankabgleich ergab, dass auch dieses vollständige Gen eine Signalsequenz enthält. Bei der Mehrzahl der isolierten Proteine handelt es sich demnach um sezernierte Antigene oder Oberflächenproteine (Übersicht Dalton et al. 2003), gegen die der Wirt spezifische Antikörper bilden kann (Lightowlers und Rickard 1988, Molinari et al. 2002). Auf dieser Basis sind diverse exkretorisch-sekretorische Parasitenantigene für die Verwendung in der Serodiagnostik kloniert worden (Kumari et al. 1994, Chung und Ko 1999, Yamasaki et al. 2000, Fong und Lau 2004). Abgesehen von Klon *Ss-37* sind in dieser Arbeit die Klone, die für sezernierte Proteine kodieren, mehr als ein Mal identifiziert worden. Die direkte Konfrontation des Wirtes mit den exkretorisch-sekretorischen Proteinen erklärt den hohen Anteil (55.5%) isolierter Klone, die für sezernierte- oder Oberflächenproteine kodieren und damit potenzielle Kandidaten für die Serodiagnostik sind.

Die Sequenzen, die für „KE-reiche Antigene“ kodieren, stellen einen Großteil (42.6%) der identifizierten Klone dar. Diese Klone wurden in 67.6% der Fälle aus der amplifizierten Bank isoliert, während sie unter Verwendung der nicht amplifizierten Bank nur 12.5% der Klone darstellten. So muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Sequenzen nicht um besonders abundante Transkripte handelt, sondern diese durch die Amplifikation der cDNA-Bank überproportional amplifiziert worden sind.

Zu den „KE-reichen Antigenen“ konnten keine bereits bekannten und charakterisierten, homologen Proteine aus den öffentlichen Datenbanken ermittelt werden. Aus diesem Grund ist es auch nicht möglich, Aussagen über eventuelle Funktionen der Antigene zu treffen.

In dem zentralen Bereich dieser Antigene sind die basische und polare Aminosäure Glutamat sowie die polare Aminosäure Lysin dominant. Die theoretische Strukturanalyse (MacVector, Accelrys) ergab für diesen Bereich eine Hydrophilie und damit verbunden einen erhöhten Oberflächenindex sowie eine erhöhte Flexibilität der Aminosäuren. Bezüglich der Sekundärstruktur wird in diesem Bereich ist eine  $\alpha$ -Helix vorhergesagt.

Die Immunogenität von Proteinen wird durch diverse Faktoren bestimmt. Dazu gehört unter anderen die Art der Seitenkette der Aminosäuren. Die am stärksten epitopbestimmenden Aminosäuren sind polare, wie z. B. Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und Arginin und solche mit großen Seitenketten (z. B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan). Immunogene Proteine sollten nach den Autoren außerdem eine hohe Flexibilität zeigen (Lottspeich und Zorbas 1998). Die polaren Aminosäuren Glutamat und Lysin sind in den repetitiven Proteinen im zentralen Bereich überdurchschnittlich hoch vertreten. Dieser zeichnet sich außerdem durch einen hohen Flexibilitätsindex aus. Des Weiteren sollten die immunogenen Abschnitte für die Erkennung frei zugänglich auf der Oberfläche des Moleküls liegen und keine  $\beta$ -Struktur aufweisen (Lottspeich und Zorbas 1998). Beide Charakteristika werden für den KE-reichen Bereich dieser Proteine vorausgesagt. Für diese spezifischen *Sarcoptes*-Proteine treffen demnach eine Reihe der Punkte zu, die die Immunogenität eines Proteins bestimmen (s. Abb. 28).

Auch für einige der anderen exprimierten Antigene treffen oben genannte Parameter zu: die Proteine der Klone *Ss-7*, *Ss-23* und *Ss-97* enthalten vermehrt Aminosäuren, die massiv zu einer Erhöhung des Antigenitätsindex der jeweiligen Epitope beitragen. Dazu gehören auch die Umkehrungen in der Polypeptidkette, bedingt durch das vermehrte Auftreten von Prolin bzw. Glycin im Fall der Klone *Ss-23* bzw. *Ss-97*. Die Strukturanalyse des Proteins von Klon *Ss-134* sagt für den zentralen Bereich eine Hydrophobie voraus, der außerdem eine erhöhte Flexibilität aufweist. Auch hydrophobe Bereiche können immunogen sein, sofern sie flexibel sind. Auf diese Weise können sich die Epitope, die durch die Hydrophobie der betreffenden Aminosäuren nicht an der Oberfläche exponiert sind, dem Antikörper zuwenden und so eine Bindung eingehen (persönliche Mitteilung Dr. R. Volkmer-Engert). Der erhöhte Antigenitätsindex zeigt für diesen Klon die potenzielle Immunogenität, die hier durch die Hydrophobie und nicht durch die Hydrophilie der Aminosäuren bedingt ist. Insgesamt gesehen tritt die polare Aminosäure Lysin bei allen diesen Antigenen überproportional häufig auf (*Ss-7* 20.08%, *Ss-14* 27.35%, *Ss-23* 29.47%, *Ss-97* 15.76%), gefolgt von Glutamat (*Ss-7* 19.69%, *Ss-14* 23.82%, *Ss-97* 12.73%). Auch Ramachandran et al. (1998) isolierten auf der Suche nach rekombinanten Antigenen für die Diagnose der Strongyloidose diverse Proteine, die viele geladene

Aminosäuren und auffällig viele Proline, die zu Umkehrungen in der Polypeptidkette führen, enthielten.

Die in dieser Arbeit isolierten Antigene erfüllen somit in der Mehrzahl die theoretischen Anforderungen an ein Immunogen.

Auf Grund der Tatsache, dass bei den Klonen *Ss-7*, *-23* und *-97* kein Stop-Codon ermittelt werden konnte, wurden diese stromaufwärts des vermeintlichen Poly-A-Anhangs kloniert. Auf Grund des fehlenden Stop-Codons ist allerdings anzunehmen, dass es sich hierbei lediglich um eine Adenin-reiche Region und nicht um den Poly-A-Anhang des Transkriptes handelt. Der offene Leserahmen eines Adenin-Tripletts kodiert für die immunogene Aminosäure Lysin (s. o.), so dass empfohlen wird, in Zukunft diesen Bereich der Transkripte in die Klonierung für die Expression mit einzubeziehen.

Die Proteine der Klone *Ss-23*, *-97* und *-134* sowie die der „KE-reichen Antigene“-kodierenden enthalten repetitive Domänen, die in den „KE-reichen Antigenen“ besonders ausgeprägt sind. Sich wiederholende Regionen innerhalb der verschiedensten Proteine sind bei eukaryotischen Parasiten häufig zu beobachten. Diese Regionen zeichnen sich durch das bevorzugte Auftreten bestimmter Aminosäuren (N, A, D, V, P, E, G, Q und S) aus, während andere (C, M, F, W, Y, I und L) selten vorhanden sind (Übersicht Schofield 1991). Auch in den hier isolierten Klonen, die repetitive Domänen enthalten, treten die Aminosäuren N, E, G und Q vermehrt auf. Catmull et al. (1994) haben ein unlösliches Protein mit repetitiven Domänen von *Onchocerca* ssp. beschrieben, das von Seren infizierter Patienten erkannt wurde. Unter diversen anderen repetitiven Parasitenantigenen wurden aus *Leishmania major* mittels eines Immunoscreenings mit Kaninchenserum zwei Proteine isoliert, die repetitive Regionen enthalten (Wallis und McMaster 1987). Auch das stadienspezifische Protein *Pfs230* von *Plasmodium falciparum* stellt ein immundominantes repetitives Antigen dar (Williamson et al. 1996). Für Arthropoden sind bisher keine Antigene beschrieben worden, die derartige Regionen aufweisen. Die Rolle von repetitiven Bereichen in Parasitenantigenen ist von Anders et al. (1986) als Präsentation einer Reihe von kreuzreagierenden Epitopen beschrieben worden, die mit der Reifung von potenziell protektiven Antikörpern interferieren. Schofield (1991) hat diese Hypothese ausgebaut, indem er auf eine Funktion der repetitiven

Bereiche in der Immunevasion, durch die Induktion einer T-Zell- unabhängigen B-Zell-Aktivierung des Parasiten, verwies. Antikörper gegen die repetitiven Regionen zeigen nur in artifiziellen Versuchen einen inhibitorischen Effekt auf den Parasiten, sind aber sonst nicht protektiv (Schofield 1991). Die repetitiven Domänen könnten als „Designer“-B-Zell-Epitope fungieren, indem sie wichtige Moleküle auf antigen-spezifische B-Zellen fokussieren und bei diesem Prozess die Antikörper gegen benachbarte Regionen unterdrückten (epitopische Suppression). Gleichzeitig würden die Oberflächen-Antikörper auf den B-Zellen kreuzvernetzt. Auch bei *Leishmania* und *Onchocerca* spp. wird ein Zusammenhang zwischen repetitiven Proteinen und der Immunevasion des Parasiten diskutiert (Wallis und McMaster 1987, Catmull et al. 1994).

Die Klone, die für die „KE-reichen Antigene“ kodieren, sind während des Immunoscreenings überproportional häufig (42.6%) isoliert worden, was für eine starke Immundominanz spricht. Dieses Kriterium wird von Schofield (1991) ebenfalls als ein Parameter für seine Hypothese angeführt. Es wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ob die isolierten Antigene Antikörperantworten gegen Proteinregionen außerhalb der repetitiven Domänen auslösen. Für eine Aussage über eine immunevasive Funktion der repetitiven Regionen wäre es allerdings nötig, zu wissen, gegen welche Epitope der Proteine die Antikörper des Wirtes gerichtet sind. Auf Grund der Tatsache, dass die für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Klone zum Teil große Differenzen zumindest am C-Terminus aufweisen, allen aber ein mehr oder weniger ausgeprägter repetitiver KE-Bereich gemeinsam ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Antikörperreaktion gegen diesen Bereich gerichtet ist. Diese Tatsache spricht für eine Rolle dieser Epitope in der Immunevasion der Parasiten.

Die Funktion der Immunevasion wird auch für die *SMIPPs* (Scabies Mite Inactivated Protease Paralogues) (Holt et al. 2003) diskutiert, die Homologien zu dem in dieser Arbeit isolierten Klon *Ss-37* zeigen. Die Autoren isolierten eine Multigenfamilie mit mindestens 24 Mitgliedern, die Homologien zu einem Serinprotease-Allergen von *D. pteronyssinus* zeigten. Abgesehen von einem Isolat, war die Voraussage der katalytischen Aktivität auf Grund von Mutationen in aktiven Zentren der Proteine für alle anderen Isolate negativ. Holt et al. (2003) stellten die Hypothese auf, dass die inaktiven Proteine der Immunevasion des Parasiten dienen, indem diese Antikörper

binden könnten, und auf diese Weise die aktiven Proteasen vor der Blockierung durch Antikörper schützten. Der in dieser Arbeit isolierte Klon Ss-37 kodiert ebenfalls für ein vermeintlich inaktives Enzym. Wie allen *SMIPPs* fehlt auch diesem Klon das aktive Serin im katalytischen Zentrum, das durch ein Glutamat ersetzt ist. Auch eine intakte katalytische Triade (H, D und S) wird nicht kodiert. Vier der sechs konservierten Cysteine fehlen, darunter auch die beiden das aktive Serin flankierenden (s. Abb. 14), die im Allgemeinen in S1 Chymotrypsin-Familien über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Rawlings und Barrett 1994). Dahingegen befand sich ein potenziell aktives Enzym nicht unter den sequenzierten, mittels des Immunoscreenings gefundenen Klonen. Diese Tatsache weist nicht darauf hin, dass vermehrt Antikörper gegen das inaktive Enzym gebildet wurden, sondern bestätigt das vermehrte Auftreten der inaktiven Form (Holt et al. 2003) des Enzyms. Allerdings bleibt zu beweisen, ob diese inaktiven Enzyme tatsächlich der Immunevasion dienen.

In dieser Arbeit wurden erste Versuche durchgeführt, um das allergene Potenzial des Klons Ss-37, der Homologien zu dem Allergen *Der f III* von *D. farinae* (Nishiyama et al. 1997) zeigt, anhand von drei Skabies-positiven Seren im Mediatorfreisetzungstest zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Parallel wurde auch das Gesamtantigen der Milben auf die allergene Wirkung untersucht. Für beide Antigene konnte diese bislang nicht nachgewiesen werden.

Es existieren diverse Berichte über die humorale Antwort in *Sarcoptes*-positiven Patienten, in denen ebenfalls nur teilweise eine erhöhte IgE Antwort ermittelt wurde (Übersicht Arlian 1996, Morgan et al. 1997, Arlian et al. 2004). In den meisten rekombinant in *E. coli* hergestellten Allergenen bleiben die IgE-bindenden Epitope erhalten und die Proteine zeigen eine zu dem nativen Allergen vergleichbare IgE-Reaktivität (Übersicht Chapman et al. 2000). Allerdings wird auch von rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteinen, wie z. B. dem heterodimeren Allergen *Fel d I* aus der Katze, berichtet, deren IgE-Reaktivität erst nach einer Reassoziierung und Rückfaltung der Proteine vergleichbar hoch wie die des nativen Proteins war (Keating et al. 1995).

Für definitive Aussagen über das allergene Potenzial dieses Antigens muss dieses mit einer größeren Anzahl von Seren getestet werden. Die prokaryotische Expression des Klons Ss-37 kann ein Grund für das nicht nachweisbare allergene Potenzial sein.

Allerdings ist es auch möglich, dass die verwendeten Patientenseren keine IgE-Antikörper gegen das Protein des Klon *Ss-37* enthielten, da diese hier auch nicht gegen das Gesamtantigen von *S. scabiei* nachgewiesen werden konnten.

Harumal et al. (2003) haben mittels eines Hyperimmunserums von Kaninchen einen Klon *Ssag2* isoliert, der homolog zu dem in dieser Arbeit gefundenen Klon *Ss-97* ist. Die Autoren haben keine Studien über die Eignung des rekombinanten Antigens für die Serodiagnostik unternommen, und so liegen auch keine Berichte über die Spezifität bzw. Sensitivität dieses Proteins vor. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass es sich bei diesem Protein definitiv um einen Bestandteil der *Sarcoptes*-Milben handelt. In der vorliegenden Studie wurde der Klon *Ss-97*, der insgesamt drei Mal isoliert wurde und bei dem die Strukturanalyse einen potenziell erhöhten Antigenitätsindex ergibt, ebenfalls durch eine immunologische Reaktion mit dem Humanserum detektiert. Allerdings zeigten sowohl die negativen Human- als auch Schweineseren eine Reaktion mit dem Antigen, so dass das Protein unter diesen Expressionsbedingungen (s. u.) keinen Wert für die serologische Diagnostik hat.

Auch der Klon *Ss-134* wurde in anderen Studien (Fischer et al. 2003) isoliert. Allerdings handelte es sich bei diesen Untersuchungen nicht um immunologische, sondern um die Sequenzierung diverser ESTs. Die Autoren schlossen wegen der Abundanz des Moleküls und des Vorhandenseins diverser Sequenzwiederholungen innerhalb der Gensequenz auf eine potenzielle Eignung des Proteins für die Serodiagnostik. Die strukturelle Analyse des Klon *Ss-134* weist ebenfalls auf eine erhöhte Immunogenität des Moleküls hin. Besonders der mit Glycinen angereicherte Bereich verursacht auf Grund der daraus resultierenden Umkehr in der Polypeptidkette einen theoretisch erhöhten Antigenindex des Proteins. Dieser Klon konnte in dieser Arbeit allerdings trotz verschiedener Optimierungen des Expressionssystems nicht zur Expression gebracht werden (s. Punkt 4.4).

Sandeman (2001) beschrieben in einer Patentschrift diverse Antigene, die von den Autoren im ELISA auf Antikörperreaktionen im Serum von *Sarcoptes*-infizierten Schweinen getestet wurden. Zu den parasiteneigenen Proteinen, die starke Reaktionen mit dem Serum zeigten, gehörten hier die  $\alpha$ -Amylase sowie einige Serin-Proteasen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Trypsin-ähnliche



Serin-Protease (Ss-37) gefunden. Trypsine sind im Dünndarm auftretende Verdauungsenzyme, die mit dem Kot ausgeschieden werden. Damit gehören sie zu den antigenwirksamen Bestandteilen bei einer *Sarcoptes*-Infektion, die in Form von Kot, Eiern, möglicherweise als Sekrete aus den Geschlechtsorganen und besonders als Speicheldrüsensekret in den Wirt abgegeben werden (Matthes et al. 1992, Arlian et al. 1994b). Der Protein von Klon Ss-37 zeigte im ELISA signifikante Differenzen zwischen den Reaktionen sowohl der humanen als auch der porzinen Positiv- und Negativseren. Allerdings ist die unspezifische Hintergrundsreaktion der negativen Schweineseren sehr hoch (s. u.). Bei den Humanseren ist eine hohe Reaktion des Serums S17 zu beobachten, das von einem Hausstaubmilbenallergiker stammt. Auf Grund dieser Reaktion muss davon ausgegangen werden, dass unter Verwendung des Antigens von Klon Ss-37 im ELISA Kreuzreaktionen mit Hausstaubmilben auftreten werden. Für eine detaillierte Aussage sollte hier eine große Anzahl von Allergikerseren getestet werden.

Die  $\alpha$ -Amylase der *Sarcoptes*-Milben befand sich dagegen nicht unter den sequenzierten Isolaten. Auch zwei von *S. scabiei* bekannte rekombinante Antigene, das *Ssag1* mit Homologien zu dem Hausstaubmilbenallergen *M 177* (Harumal et al. 2003) und das Paramyosin (Mattson et al. 2000), die beide mittels eines Immunoscreenings mit Kaninchenseren isoliert wurden, wurden in dieser Arbeit nicht identifiziert. Auch hier könnte der Grund in der unterschiedlichen Antigen-Erkennung bei verschiedenen Wirten liegen (Arlian et al. 1996a).

Im ELISA sind hohe Hintergrundsreaktionen der Schweineseren mit den rekombinanten Antigenen zu beobachten. Im Vergleich zu dem Menschen sind die Schweine ihren Exkrementen, und damit auch *E. coli*-Bakterien, wesentlich direkter ausgesetzt. Es ist aus diesem Grund nicht verwunderlich, wenn vermehrt Antikörper gegen *E. coli*-Proteine gebildet werden. Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Antigene wurden in dem prokaryotischen System *E. coli* exprimiert. Selbst nach einer Aufreinigung dieser Proteine mittels einer Bindung an die spezifische Matrix und ausgiebigen Waschens verbleibt restliches *E. coli*-Protein in den Eluaten (s. Abb. 11 und 16), deren Konzentration allerdings durch die anschließende Dialyse der Eluate weiter verringert wurde. Während der Dialyse gegen Harnstoff-niedermolaren Puffer präzipitierten oft Proteine, und das

rekombinante Protein zeigte im SDS-Gel eine höhere Reinheit als vor der Dialyse. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei den Präzipitaten um *E. coli*-Proteine handelte. Allerdings verblieb auch hier restliches *E. coli*-Protein in den Eluaten, welches im ELISA ebenfalls mit den Serumantikörpern reagieren kann. Eine Präabsorption der Seren mit *E. coli*-Protein erbrachte keine Verminderung dieser unspezifischen Reaktionen. Es ist zu vermuten, dass eine derartige Präabsorption nicht ausreicht, um die entsprechenden Antikörper zu binden. Aus diesem Grund wäre in diesem Zusammenhang ein eukaryotisches Expressionssystem wie z. B. das Baculovirus für eine Serodiagnose der Räude beim Schwein zu empfehlen, da unspezifische Reaktionen gegen Insektenproteine unwahrscheinlich sein dürften.

Die unspezifischen Reaktionen der Humansenen waren in dieser Arbeit wesentlich geringer als die der Schweineseren (s. o.). Allerdings konnte hier im ELISA mit dem Fusionsprotein *Ss-18* eine hohe unspezifische Reaktion mit dem GST beobachtet werden. Auch hier führte eine Präabsorption der Seren mit reinem GST zu keiner Verminderung der unspezifischen Reaktion. Ralston und Heath (1995) empfehlen eine Fusion mit einem inerten Trägerprotein wenn eine Expression als Fusionsprotein notwendig ist, um eine Aufreinigung des Proteins zu ermöglichen. Das repetitive Protein konnte in den vorliegenden Studien nur als Fusionsprotein mit GST exprimiert werden. Es wurde nachträglich auch in das Plasmid pQE als Fusionsgen mit der Sequenz des Klons *Ss-17* am N-Terminus kloniert, um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, und gleichzeitig die unspezifische Reaktion mit dem GST zu umgehen. Allerdings konnte dieses Fusionsprotein bislang nicht in voller Länge erhalten werden, da das Gen nicht vollständig, sondern in Fragmenten unterschiedlicher Länge exprimiert wurde.

Es sind Fusionsproteine für die Diagnostik von *Onchocerca volvulus*-Infektionen beschrieben worden (Nde et al. 2002), für die eine Sensitivität von 95.5% und eine Spezifität von 97.9% bzw. 95.35% ermittelt werden konnte. Die einzelnen Proteine hatten zuvor eine Sensitivität von 93.3% bzw. zwischen 54% und 95% und eine Spezifität von 93.3% bzw. 99% gezeigt. Über die Spezifität der hier untersuchten Antigene ist bislang keine valide Aussage möglich, da diese nur mit Seren *Sarcoptes*-positiver und -negativer Patienten getestet wurden. Zu diesem Zweck müssten die Antigene mit Seren von Hausstaubmilbenallergikern und Patienten mit

anderen Arthropodeninfektionen getestet werden. Eine Kreuzreaktivität bei den rekombinanten „KE-reichen Antigenen“ ist allerdings unwahrscheinlich, da dieses nicht in Hausstaubmilben, die mit den *Sarcoptes*-Milben eng verwandt sind (Astigmata), nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund ist von einer Spezifität dieses Proteins für die parasitischen Milben auszugehen. Auch bei den hier fusionierten Antigenen (Ss-17/14) wäre eine Verbesserung der Sensitivität der Antigene denkbar, indem sie als Hybride eingesetzt würden. Die unspezifischen Hintergrundreaktionen der Negativseren könnten eventuell durch andere Blockierungsmedien, wie z. B. Milchpulver an Stelle von BSA, verringert werden. Verlängerte Blockierungszeiten hatten zu keiner Verminderung der unspezifischen Hintergrundreaktionen geführt.

Die mittleren OD<sub>450/630</sub>-Werte der ELISAs wiesen bei den Humanseren eine größere Diskrepanz zwischen den Positiv- und den Negativseren auf, als es bei den Schweineseren der Fall war (s. Punkt 3.10). Dieses kann diverse Gründe haben. Laut Arlian et al. (1996a) werden den verschiedenen Wirten durch die unterschiedlichen *Sarcoptes*-Varietäten gleiche Antigene präsentiert, aber die Wirte bilden auch Antikörper gegen Varietät-spezifische Epitope der gleichen oder unterschiedlichen Antigene. Es ist also möglich, dass in den Humanseren Antikörper vorhanden waren, die andere, spezifischere Epitope in dem betreffenden Antigen erkannten, als es in den Schweineseren der Fall war. Gleichzeitig können die geringeren Unterschiede auch in einer anderen Ursache begründet sein. Es ist davon auszugehen, dass die Schweineseren mit *E. coli*-Protein aus den Proteineluaten reagieren (s. o.). Aus diesem Grund kann diese unspezifische Reaktion die spezifische vollkommen überlagern, so dass keine Aussage über eine potenzielle Infektion möglich ist. Es muss davon ausgegangen werden, dass das Expressionssystem *E. coli* für eine Räudediagnostik mit Hilfe rekombinanter Antigene beim Schwein vollkommen ungeeignet ist. Sollten die geringeren unspezifischen Hintergrundreaktionen bei den Humanseren ebenfalls auf *E. coli*-Protein zurückzuführen sein und nicht durch andere Blockierungsmedien verringerbar, wäre das *E. coli*-Expressionssystem auch für die Skabiesdiagnostik beim Menschen unbrauchbar.

## 4.6 Charakterisierung der für die „KE-reichen Antigene-kodierenden Sequenzen

### 4.6.1 Genkopien und Transkripte

Mittels des Immunoscreenings wurden diverse Klone isoliert, die für „KE-reiche Antigene“ kodieren und sich teilweise wenig, teilweise aber massiv unterscheiden. Allen gemeinsam ist der repetitive zentrale, hauptsächlich aus den Nukleotiden Guanin und Adenin bestehende Bereich, der allerdings in unterschiedlicher Ausprägung auftritt. Die größten Unterschiede sind am 3'-Ende dieser Klone zu beobachten, während sich die 5'-Bereiche nur geringfügig voneinander unterscheiden. In der Southern Blot-Analyse wurde unerwarteterweise nur eine Kopie des Gens nachgewiesen. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass für die Ausbildung der unterschiedlichen Transkripte posttranskriptionale Modifikationen verantwortlich sind, wie die des „alternativen Spleißens“ („Alternative Splicing“) sowie des Editierens von RNA („RNA Editing“).

Durch das alternative Spleißen können aus einem Primärtranskript viele unterschiedliche mRNAs gebildet werden, die dann für unterschiedliche Proteine kodieren können. Dieses erfolgt durch das Einfügen oder Entfernen von Exons, oder aber auch durch das Verlängern bzw. Kürzen der Exons (Übersicht Cartegni et al. 2002). Die Komplexität des Proteoms wird auf diese Weise stark erhöht.

Das Editieren der RNA ist ein weiterer Prozess, bei dem die genetische Information des Primärtranskriptes geändert wird. Hier wird zwischen der Insertion bzw. Deletion und der Änderung von Nukleotiden unterschieden, bei denen es zum Teil zu einer Änderung des offenen Leserahmens kommt. Besonders in der mitochondrialen RNA von Trypanosomen ist dieser Mechanismus detailliert beschrieben worden (Harris et al. 1990, Adler et al. 1991, Übersicht Hajduk et al. 1997). Der Vorgang des RNA-Editierens erfolgt meistens vor dem des RNA-Spleißens. Durch z. B. das Einfügen neuer Spleißstellen kann das RNA-Editieren Einfluss auf den Spleißvorgang haben und eventuell den offenen Leserahmen verändern (Rueter et al. 1999). In Ratten wurden vier *ADAR2* Transkripte, die durch gewebespezifisches alternatives Spleißen entstehen, identifiziert (Rueter et al. 1999). Von den in dieser Arbeit isolierten Klonen unterscheidet sich z. B. der Klon *Ss-10* durch das Vorhandensein eines Fragmentes

im zentralen repetitiven Bereich von den anderen Klonen, denen dieses fehlt. In den Klonen *Ss-20* und *Ss-82* ist der zentrale Bereich hingegen extrem kurz (s. Abb. 27). Gleiches gilt für den nicht repetitiven 3'-Bereich, der in dem Klon *Ss-10* vor dem vermeintlichen Poly-A-Anhang fehlt. Den Klonen *Ss-3*, *-14*, *-82*, und *-122* ist das Auftreten eines langen Bereiches am 3'-Ende der Sequenz gemein, allerdings treten hier auch wieder Unterschiede in den repetitiven Bereichen der verschiedenen Transkripte auf. Der Leserahmen in den hier isolierten Klonen unterscheidet sich nicht. Eine genaue Aussage über das alternative Splicing und das Redigieren der RNA der hier vorliegenden repetitiven Transkripte wäre allerdings nur durch die Analyse der genomischen Sequenz des Gens möglich.

Bei Arthropoden sind die Vorgänge des „alternativen Spleißens“ und des „RNA-Editierens“ für verschiedene Gene von *Drosophila* beschrieben worden (Semenov und Pak 1999, Übersicht Cartegni 2002, Peters et al. 2003).

Eine gewebespezifische Modifikation der verschiedenen Transkripte ist hier nicht zu erwarten. Das repetitive Protein wurde in den *Sarcoptes*-Milben nur in einer paarigen Struktur im posterioren Opisthosoma nachgewiesen (s. Punkt 3.9.2.4.8.2).

In der Western Blot-Analyse wurden mittels eines Mäuse-Serums, das gegen das Protein des Klons *Ss-18/GST* gerichtet war, fünf Proteinbanden detektiert. Im Hinblick auf die Anzahl der verschiedenen Transkripte, die hier isoliert wurden, ist die Anzahl der Proteine gering. Es ist aber, auf Grund der überwiegend ähnlichen Größen der Transkripte, wahrscheinlich, dass sich hinter diesen fünf Proteinbanden weitere Proteine der gleichen oder ähnlichen Größe verbergen. Diese können allerdings in einem nur 10%igen, eindimensionalen SDS-Gel nicht voneinander unterschieden werden.

Eine andere Ursache für die verminderte Proteinanzahl im Vergleich zu der der Transkripte könnte die posttranskriptionale Genregulation im Cytoplasma sein, bei der die mRNA, kontrolliert durch verschiedenste Mechanismen, abgebaut werden kann (Übersicht Brennan und Steitz 2001). Die Stabilisierung oder Destabilisierung einer mRNA stellt einen wichtigen Kontrollpunkt der Genexpression dar, bei der die kodierende Information der RNA nicht mehr geändert wird. Für die vorliegenden Sequenzen würde dies bedeuten, dass die Transkripte, die *in vivo* keine Proteine

ausbilden, nur durch die Klonierung in den Expressionsvektor exprimiert wurden. Iarovaia et al. (2001) berichten von Alpha-Globin-Genen, die zwar in Leukämiezellen von Hühnern voll transkribiert werden, deren mRNAs aber in dem perinukleären Bereich akkumulieren und in den nicht differenzierten Zellen temporär zurückgehalten werden. Es liegen allerdings keine Berichte darüber vor, dass ein Organismus nur eine Genkopie eines bestimmten Gens ausbildet, diverse Transkripte entwickelt, um dann wieder eine geringe Anzahl dieser Transkripte zu exprimieren, so wie es für die hier beschriebenen Transkripte der Fall zu sein scheint.

Interessanterweise konnte das für die „KE-reichen Antigene“-kodierende Gen in den freilebenden Hausstaubmilben (*D. pteronyssinus*) nicht nachgewiesen werden. Dieses ist umso überraschender, da die *Dermatophagoides*-Milben, wie auch die *Sarcoptes*-Milben, zu der Gruppe der Astigmata gehören und damit in enger Verwandtschaft zueinander stehen. Das Gen, das für die „KE-reichen Antigene“ kodiert ist folglich spezifisch für die parasitischen Milben, allerdings bleibt nachzuweisen, ob dieses auch im Vergleich zu anderen parasitischen Milben der Gruppe der Astigmata, wie *Psoroptes* sp. oder *Chorioptes* sp., gilt. Sollte sich das repetitive Protein als diagnostisches Antigen erweisen, sollten hier zumindest Kreuzreaktionen mit Hausstaubmilbenantigenen keine Rolle spielen, welche in der *Sarcoptes*-Diagnostik ein bedeutendes Problem darstellen (Übersicht Arlian 1996). Auch das Hausstaubmilbenallergikerserum S17 reagiert, im Vergleich zu den anderen Antigenen, verhältnismäßig niedrig mit diesem Antigen. Die Hintergrundsreaktion könnte auf die Reaktion mit dem GST zurückzuführen sein.

#### 4.6.2 Lokalisierung der „KE-reichen Antigene“

Für die Lokalisierung der „KE-reichen Antigene“ in der *Sarcoptes*-Milbe wurden Peptide aus dem N- und C-Terminus sowie der zentralen Region des Proteins synthetisiert. Die Aminosäuresequenz dieser Peptide wurde mit Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken abgeglichen, um Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zu vermeiden. Nur das  $\alpha$ -PeptidA2-Serum zeigte im ELISA sehr geringe Reaktion mit dem Gesamtantigen der *Sarcoptes*-Milben, so dass lediglich das Serum der BALB/c-

Mäuse, die gegen dieses Peptid aus der zentralen Region der Proteine immunisiert worden waren, für die Immunhistochemie verwendet werden konnte. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Gefrierschnitte konnte mittels der FITC-markierten Antikörper eine paarige Struktur im posterioren Teil des Opisthosomas detektiert werden, die nur mit dem Serum der immunisierten BALB/c-Mäuse, nicht aber mit dem Negativserum reagierte (s. Abb. 34). Die Milben, die für diese Aufnahmen verwendet wurden, waren im Vorfeld nicht nach Männchen und Weibchen getrennt worden, so dass eine Aussage über das Geschlecht der markierten Milben nicht möglich war. Auffallend war aber, dass in den Milben, die ein Ei im Uterus trugen, und damit eindeutig als Weibchen zu identifizieren waren, die paarige Struktur nicht detektiert wurde. Vorausgesetzt, dass es sich bei den identifizierten Proteinen nicht um stadienspezifisch exprimierte Gene handelt, war dies ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei der Struktur um ein Organ der männlichen Milben handelte. Mittels der Peroxidase-markierten Antikörper konnten auf Grund hoher Hintergrundreaktionen keine spezifischen Strukturen detektiert werden. In Semidünnschnitten mit anschließender Methylenblaufärbung (s. Abb. 35) wurde in einem Individuum unbekannten Geschlechts ebenfalls ein paariges Organ sichtbar, dessen Struktur und Inhalt in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (s. Abb. 36) auf Hoden hinweisen könnte (persönliche Mitteilung Dr. G. Brennan, Queens University Belfast). Die Hoden der Astigmata sind paarig und die Spermatozoen wie bei allen Acari vom aflagellaten Typ (Evans 1992). Zumindest die paarigen Hoden betreffend würde dies für die in den Semidünnschnitten mit anschließender Methylenblaufärbung identifizierte Struktur zutreffen. Spermien konnten bislang nicht identifiziert werden. Für die Aufklärung der paarigen Struktur in ein und demselben Individuum wurden Milben nach Geschlecht getrennt, indem Männchen als kleiner als die Weibchen und dunkler als die Nymphen identifiziert wurden (Walton et al. 2004). Zum jetzigen Zeitpunkt werden Immunogoldmarkierungen anhand des  $\alpha$ -PeptidA2- sowie des  $\alpha$ -Ss-18/GST-Serums und anschließender Elektronenmikroskopie mit den separierten Milben unternommen. Eier sowie Sekrete aus den Geschlechtsorganen der Milben gelten als antigenwirksame Bestandteile bei einer *Sarcoptes*-Infektion (Matthes et al. 1992, Arlian et al. 2000). Es handelt sich hierbei um Komponenten, die in jedem Fall, nicht erst durch das Absterben des Parasiten, in Kontakt mit dem Wirt treten. Sollte es sich

bei den Antigenen tatsächlich um Proteine aus dem Geschlechtssystem der männlichen Milben handeln, könnte dieses auf Grund der permanenten Konfrontation des Wirts-Immunsystems ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich hierbei um Proteine handelt, die der Immunevasion der Milben dienen. Antigene, die dem Wirt nicht ständig präsentiert werden, können in der Immunevasion keine bedeutende Rolle einnehmen.

Abschließend ist zu bemerken, dass die „KE-reichen Antigene“ sowohl in der Milbenvarietät des Schweines (Immunoscreening) als auch in der des Rindes (Immunlokalisation) nachgewiesen werden konnten. Durch die Isolierung der Klone mittels der Humansenen wurden auch im Menschen Antikörper gegen diese Antigene ermittelt, was darauf hinweist, dass die „KE-reichen Antigene“ ihrem Wirt auch von *S. scabiei* var. *hominis* präsentiert werden. Auf Grund des weiten Spektrums könnten sich diese Antigene, sofern sich auch in den anderen Wirten Antikörper nachweisen lassen, als Diagnostikkandidat sowohl für Skabies-Infektionen beim Menschen als auch für Räude-Infektionen bei diversen Tieren eignen.



## 5 Ausblick

In dieser Arbeit wurden rekombinante Antigene der *Sarcoptes*-Milbe bereitgestellt, die potenzielle Kandidaten für die Serodiagnostik der Skabies-Infektion darstellen. Serologische Untersuchungen besonders mit den porzinen Seren zeigten unspezifische Reaktionen, die vermutlich durch *E. coli*-Protein in den Eluatn der Antigene bedingt sind. Die Klonierung in ein anderes Expressionssystem, wie z. B. das Baculovirus, könnte die Spezifität der rekombinanten Antigene optimieren. In anderen Arbeiten wurden die Spezifität und Sensitivität von diagnostischen Antigenen durch die Synthese von Hybriden optimiert (Nde et al. 2002). Die Fusion der Proteine *Ss-17* und *Ss-14* wurde begonnen, da der Einsatz eines fusionierten Proteins auch hier das diagnostische Potenzial einiger Antigene verbessern könnte.

Eine interessante Fragestellung ist die Ermittlung von Epitopen der rekombinanten Antigene. Durch die Klonierung dieser Fragmente für den Einsatz im ELISA könnten schwach immunogene oder kreuzreagierende Bereiche aus den kompletten Antigenen eliminiert und die Spezifität des jeweiligen Antigens erhöht werden.

Die Aufklärung der genomischen Sequenz sowie die Analyse der Spleißstellen in dem für die „KE-reichen Antigene“-kodierenden Gen könnten im Hinblick auf posttranskriptionale Modifikationen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Molekularbiologie der *Sarcoptes*-Milben liefern.

Die Frage nach der Lokalisation der „KE-reichen Antigene“ in der Milbe konnte bislang nicht geklärt werden. Die Aufklärung könnte Hinweise auf die Funktion dieser Proteine liefern und weitere Spekulationen über ihre potenzielle Rolle in der Immunevasion zulassen. Die Hypothese, die „KE-reichen Antigene“ dienen der Immunevasion, bleibt eine interessante Fragestellung, da diese für diverse repetitive Parasitenantigene diskutiert wird (Wallis und McMaster 1987, Schofield 1991, Catmull et al. 1994).

In dieser Arbeit wurden diverse Klone isoliert, die für sekretorische- oder Oberflächen-Proteine kodieren. Derartige Proteine sind in der Literatur als potenzielle Vakzinekandidaten beschrieben worden (Zang et al. 2000, Beghetto et al. 2001, Scheiblhöfer et al. 2001, Übersicht Dalton et al. 2003). Die hier identifizierten, sezernierten Antigene könnten einen Beitrag zu Vakzinierungsstudien mit *S. scabiei*, gegen die bislang keine Vakzine besteht, leisten.

## 6 Literatur

ADAM, R., B. KALTMANN, W. RUDIN, T. FRIEDRICH, T. MARTI und R. LUCIUS (1996): Identification of chitinase as the immunodominant filarial antigen recognized by sera of vaccinated rodents. J. Biol. Chem. 271 (3), S. 1441-1447.

ADLER, B. K., M. E. HARRIS, K. I. BERTRAND und S. L. HAJDUK (1991): Modification of *Trypanosoma brucei* Mitochondrial rRNA by Posttranscriptional 3' Polyuridine Tail Formation. Mol. Cel. Biol. 11 (12), S. 5878-5884

ALONSO DE VEGA, F., J. MENDEZ DE VIGO, J. ORTIZ SANCHEZ, C. MARTINEZ-CARRASCO PLEITE, A. ALBALADEJO SERRANO und M. R. RUIZ DE YBANEZ CARNERO (1998): Evaluation of the prevalence of sarcoptic mange in slaughtered fattening pigs in southeastern Spain. Vet. Parasitol. 76 (3), S. 203-209

ANDERS, R. F. (1986): Multiple cross-reactivities amongst antigens of *Plasmodium falciparum* impair the development of protective immunity against malaria. Parasite Immunol. 8 (6), S. 529-539

ARENDS, J. J., C. M. STANISLAW und D. GERDON (1990): Effects of sarcoptic mange on lactating swine and growing pigs. J. Anim. Sci. 68 (6), S. 1495-1499

ARLIAN, L. G., D. L. VYSZENSKI-MOHER und A. M. GILMORE (1988): Cross-Antigenicity Between *Sarcoptes scabiei* and the House Dust Mite, *Dermatophagoides farinae* (Acari: Sarcoptidae and Pyroglyphidae). J. Med. Entomol. 25 (4), S. 240-247.

ARLIAN, L. G., D. L. VYSZENSKI-MOHER und M. J. POLE (1989): Survival of adults and development stages of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* when off the host. Exp. Appl. Acarol. 6, S. 181-187

ARLIAN, L. G., D. L. VYSZENSKI-MOHER, S. G. AHMED und S. A. ESTES (1991): Cross-antigenicity between the scabies mite, *Sarcoptes scabiei*, and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*.

J. Invest. Dermatol. 96 (3), S. 349-54

ARLIAN, L. G., D. BERNSTEIN, I. L. BERNSTEIN, S. FRIEDMAN, A. GRANT, P. LIEBERMAN, M. LOPEZ, J. METZGER, T. PLATTS-MILLS und M. SCHATZ (1992): Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States.

J. Allergy Clin. Immunol. 90 (3 Pt 1), S. 292-300

ARLIAN, L. G., C. M. RAPP, D. L. VYSZENSKI-MOHER und M. S. MORGAN (1994a): *Sarcoptes scabiei*: Histopathological Changes Associated with Acquisition and Expression of Host Immunity to Scabies. Exp. Parasitol. 78 (1), S. 51-63

ARLIAN, L. G., M. S. MORGAN, D. L. VYSZENSKI-MOHER und B. L. STEMMER (1994b): *Sarcoptes scabiei*: The Circulating Antibody Response and Induced Immunity to Scabies. Exp. Parasitol. 78, S. 37-50

ARLIAN, L. G., C. M. RAPP und M. S. MORGAN (1995): Resistance and immune response in Scabies-infested hosts immunized with *Dermatophagoides* mites.

Am. J. Trop. Med. Hyg. 52 (6), S. 539-545

ARLIAN, L. G. (1996): Immunology of scabies. Wikel, S. K. ed., in: The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships.

Wallingford, UK: CAB International, S. 232-257

ARLIAN, L. G., M. S. MORGAN und J. J. ARENDS (1996a): Immunologic cross-reactivity among various strains of *Sarcoptes scabiei*. J. Parasitol. 82 (1), S. 66-72

ARLIAN, L. G., M. S. MORGAN, C. M. RAPP, und D. L. VYSZENSKI-MOHER (1996b): The development of protective immunity in canine scabies.

Vet. Parasitol. 62 (1-2), S. 133-142

ARLIAN, L. G., D. L. VYSZENSKI-MOHER, C. M. RAPP und B. A. HULL (1996c): Production of IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  by human skin equivalents parasitized by *Sarcoptes scabiei*. J. Parasitol. 82 (5), S. 719-723

ARLIAN, L. G. und M. S. MORGAN (2000): Serum antibody to *Sarcoptes scabiei* and house dust mite prior to and during infestation with *S. scabiei*. Vet. Parasitol. 90 (4), S. 315-326

ARLIAN, L. G. (2002): Arthropod allergens and human health. Annu. Rev. Entomol. 47, S. 395-433

ARLIAN, L. G., M. S. MORGAN und J. S. NEAL (2003): Modulation of cytokine expression in human keratinocytes and fibroblasts by extracts of scabies mites. Am. J. Trop. Med. Hyg. 69(9), S. 652-656

ARLIAN, L. G., M. S. MORGAN, S. A. ESTES, S. F. WALTON, D. J. KEMP und B. J. CURRIE (2004): Circulating IgE in Patients with Ordinary and Crusted Scabies. J. Med. Entomol. 41 (1), S. 74-77

BEGHETTO, E., A. PUCCI, O. MINENKOVA, A. SPADONI, L. BRUNO, W. BUFFOLANO, D. SOLDATI, F. FELICI und N. GARGANO (2001): Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. Int J. Parasitol. 31 (14), S. 1659-1668

BERRILLI, F., S. D'AMELIO und L. ROSSI (2002): Ribosomal and mitochondrial DNA sequence variation in *Sarcoptes* mites from different hosts and geographical regions. Parasitol. Res. 88 (8), S. 772-777

BEZOLD, G., M. LANGE, R. SCHIENER, G. PALMEDO, C. A. SANDER, M. KERSCHER und R. U. PETER (2001): Hidden scabies: diagnosis by polymerase chain reaction. Br. J. Dermatol. 144 (3), S. 614-618

BORNSTEIN, S. und P. WALLGREN (1997): Serodiagnosis of sarcoptic mange in pigs. Vet. Rec. 141 (1), S. 8-12

BOIX, V., J. SANCHEZ-PAYA, J. PORTILLA und E. MERINO (1997): Nosocomial outbreak of scabies clinically resistant to lindane.

Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18 (10), S. 677

BÖCK, P. (Hrsg.) (1989): Schnellfärbung von Semidünnschnitten. in: Romeis Mikroskopische Techniken. Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore, 17. Aufl., S. 247-249

BRADLEY, J. E., R. HELM, M. LAHAISE und R. M. MAIZELS (1991): cDNA clones of *Onchocerca volvulus* molecular weight antigens provide immunologically specific diagnostic probes. Mol. Biochem. Parasitol. 46 (2), S. 219-228

BRENNAN, C. M. und J. A. STEITZ (2001): HuR and mRNA stability.

Cell. Mol. Life Sci. 58 (2), S. 266-277

BROOKS, P. und R. F. GRACE (2002): Ivermectin is better than benzyl benzoate for childhood scabies in developing countries. J. Pediatr. Child Health 38, S. 401-404

BUFFET, M. und N. DUPIN (2003): Current treatments for scabies.

Fundam. Clin. Pharmacol. 17 (2), S. 217-225

BURGESS, I. (1994): *Sarcoptes scabiei* and Scabies. Adv. Parasitol. 33, S. 235-292

CARTEGNI, L., S. L. CHEW und A. R. KRAINER (2002): Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutation that affect splicing.

Nat. Rev. Genet. 3 (4), S. 285-298

CATMULL, J., D. ZHANG, F. RUGGIERO, D. B. COPEMAN und D. J. MILLER (1994): Identification and characterisation of a novel repetitive antigen from *Onchocerca* spp.. Mol. Biochem. Parasitol. 63 (1), S. 49-57

CHAHAN, B., I. GATURAGA, X. HUANG, M. LIAO, S. FUKUMOTO, H. HIRATA, Y. NISHIKAWA, H. SUZUKI, C. SUGIMOTO, H. NAGASAWA, K. FUJISAKI, I. IGARASHI, T. MIKAMI und X. XUAN (2003): Serodiagnosis of *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbant assay with recombinant truncated NcSAG1. Vet. Parasitol. 118 (3-4), S. 177-185

CHAPMAN, M. D., A. M. SMITH, L. D. VAILES, K. ARRUDA, V. DHANARAJ und A. POMES (2000): Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 106(3), S. 409-418

CHOSIDOW, O. (2000): Scabies and pediculosis. Lancet 355 (9206), S. 819-826

CHO-NGWA, F., M. AKOACHERE und V. P. K. TITANJI (2003): Sensitive and specific serodiagnosis of river blindness using *Onchocerca ochengi* antigens. Act. Tropica 89 (1), S. 25-32

CHUNG, Y.Y.Y. und R. C. KO (1999): A novel cDNA clone encoding a specific excretory/secretory antigen of larval *Trichinella pseudospiralis*. Parasitol. Res. 85 (8-9), S. 685-691

CORNELISSEN, J. B. W. J., C. P. H. GAASENBEEK, F. H. M. BORGSTEEDE, W. G. HOLLAND, M. M. HARMSSEN und W. J. A. BOERSMA (2001): Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L-like protease. Int. J. Parasitol. 31 (7), S. 728-737

CURRIE, B. J., C. M. CONNORS und V. L. KRAUSE (1994): Scabies programs in Aboriginal communities. Med. J. Aust. 161 (10), S. 636-637

CURRIE, B. J. und J. R. CARAPETIS (2000): Skin infections and infestations in Aboriginal communities in northern Australia. Australas. J. Dermatol., 41 (3), S. 139-143

CURRIE, B. J., P. HARUMAL, M. MCKINNON und S. F. WALTON (2004): First Documentation of In Vivo and In Vitro Ivermectin Resistance in *Sarcoptes scabiei*. Clin. Infect. Dis. 39 (1), S. 8-12

CURTIS, C. F. (2001): Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbant assay for the diagnosis of canine sarcoptic mange. Vet. Rec. 148 (8), S. 238-239

DALTON, J. P., P. J. BRINDLEY, D. P. KNOX, C. P. BRADY, P. J. HOTEZ, S. DONNELLY, S. M. O'NEILL, G. MULCAHY und A. LOUKAS (2003): Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. Int. J. Parasitol. 33 (5-6), S. 621-640

DAVIES, P. R., P. B. BAHNSON, J. J. GRASS, W. E. MARSH, R. GARCIA, J. MELANCON und G. D. DIAL (1996): Evaluation of the monitoring of papular dermatitis lesions in slaughtered swine to assess sarcoptic mite infestation. Vet. Parasitol. 62 (1-2), S. 143-153

DAVIS, D. P. und R. D. MOON (1990): Dynamics of Swine Mange: A Critical Review of the Literature. J. Med. Entomol. 27 (5), S. 727-737

ELGART, M. L. (1996): A risk-benefit assessment of agents used in the treatment of scabies. Drug Saf. 14 (6), S. 386-393

ELGART, M. L. (1999): Current treatments for scabies and pediculosis. Skin Therapy Lett. 5 (1), S. 1-3

ELMOGY, M., H. FAYED, H. MARZOK und A. RASHAD (1999): Oral ivermectin in the treatment of scabies. Int. J. Dermatol 38 (12), S. 926-928

EVANS, G. O. (1992): Reproductive Systems. in: Principles in Acarology CAB International, University Press, Cambridge, S. 263-298

- FISCHER, K., D. HOLT, P. HARUMURAL, B. J. CURRIE, S. F. WALTON und D. J. KEMP (2003): Generation and characterization of cDNA clones from *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* for an expressed sequence tag library: identification of homologues of house dust mite allergens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68 (1), S. 61-64
- FONG, M.-Y. und Y.-L. LAU (2004): Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* 92 (2), S. 173-176
- FROHMAN, M. A., M. K. DUSH und G. R. MARTIN (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (23), S. 8998-9002
- GALLIN, M. Y., M. TAN, M. A. KRON, D. RECHNITZER, B. M. GREENE, H. S. NEWLAND, A. T. WHITE, H. R. TAYLOR und T. R. UNNASCH (1989): *Onchocerca volvulus* recombinant antigen; physical characterisation and clinical correlates with serum reactivity. *J. Infect. Dis.* 160 (3), S. 521-529
- GASSEN, H. G. und G. SCHRIMPF (2002): Gelelektrophoresen. in *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, S. 19-71
- DE GRAAF, D. C., P. BERGHEN, H. HILDERSON, H. DE COCK und J. VERCRUYSSSE (1993): Identification and purification of *Cooperia oncophora*-specific antigens to improve serological diagnosis. *Int. J. Parasitol.* 23 (1), S. 141-144
- GUTIÉRREZ, J. F., J. MENDEZ DE VIGO, J. CASTELLÁ, E. MUNOZ und D. FERRER (1996): Prevalence of sarcoptic mange in fattening pigs sacrificed in a slaughterhouse of northeastern Spain. *Vet. Parasitol.* 61 (1-2), S. 145-149
- HAJDUK, S. L., B. ADLER, S. MADISON-ANTENUCCI, M. MCMANUS und R. SABATINI (1997): Insertional and deletional RNA editing in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36, S. 15-18



HARRIS, M. E., D. R. MOORE und S. L. HAJDUK (1990): Addition of Uridines to Edited RNAs in Trypanosome Mitochondria Occurs Independently of Transcription. J. Biol. Chem. 265 (19), S. 11368-11376

HARUMAL, P., M. MORGAN, S. F. WALTON, D. C. HOLT, J. RODE, L. G. ARLIAN, B. J. CURRIE und D. J. KEMP (2003): Identification of a homologue of a house dust mite allergen in a cDNA library from *Sarcoptes scabiei* var. *hominis* and evaluation of its vaccine potential in a rabbit/*S. scabiei* var. *canis* model. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68 (1), S. 54-60

HEAD, S. E., E. M. MACDONALD, A. EWERT und P. APISARNTHANARAX (1990): *Sarcoptes scabiei* in Histopathologic Sections of Skin in Human Scabies. Arch. Dermatol. 126 (11), S. 1475-1476

VAN DER HEIJDEN, H. M. J. F., P. G. M. RAMBAGS, A. R. W. ELBERS, C. VAN MAANEN und W. A. HUNNEMANN (2000): Validation of ELISAs for the detection of antibodies to *Sarcoptes scabiei* in pigs. Vet. Parasitol. 89 (1-2), S. 94-107

HOFFMANN, A., S. VIETHS und D. HAUSTEIN (1997): Biologic allergen assay for in vivo test allergens with an in vitro model of the murine type I reaction. J. Allergy Clin. Immunol. 99 (2), S. 227-232

HOLLANDERS, W., J. VERCRUYSSSE, S. RAES und S. BORNSTEIN (1997): Evaluation of an immunosorbant assay (ELISA) for the serological daignosis of sarcoptic mange in swine. Vet. Parasitol. 69 (1-2), S. 117-123

HOLT, D. C., K. FISCHER, G. E. ALLEN, P. WILSON, R. SLADE, B. J. CURRIE, S. F. WALTON und D. J. KEMP (2003): Mechanisms for a Novel Immune Evasion Strategy in the Scabies Mite *Sarcoptes scabiei*: A Multigene Family of Inactivated Serine Proteases. J. Invest. Derm. 121 (6), S. 1419-1424

HOLT, D.C., K. FISCHER S.J. PIZZUTTO, B.J. CURRIE, S.F. WALTON und KEMP D.J. (2004): A multigene family of inactivated cysteine proteases in *Sarcoptes scabiei*. J. Invest. Dermatol. 123 (1), S. 240-241

IAROVAIA, O., S. V. RAZIN, G. LINARES-CRUZ, N. SJAKSTE und K. SCHERRER (2001): In Chicken Leukemia Cells Globin Genes Are Fully Transcribed but Their RNAs Are Retained in the Perinucleolar Area. Exp. Cell Res. 270 (2), S. 159-165

INOUE, H., H. NOJIMA und H. OKAYAMA (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96 (1), S. 23-28

JACOBSON, M., S. BORNSTEIN und P. WALLGREN (1999): The efficacy of simplified eradication strategies against sarcoptic mange mite infections in swine herds monitored by an ELISA. Vet. Parasitol. 81 (3), S. 249-258

JACOBSON, M., S. BORNSTEIN, E. PALMER und P. WALLGREN (2000): Elimination of *Sarcoptes scabiei* in pig herds by single or double administrations of an avermectin. Acta Vet. Scand. 41 (3), S. 227-235

KAMBARAGE, D. M., P. MSOLLA und J. FALMER-HANSEN (1990): Epidemiological studies of Sarcoptic mange in Tanzanian pig herds. Trop. Anim. Hlth. Prod. 22, S. 226-230

KATENDE, J., S. MORZARIA, P. TOYE, R. SKILTON, V. NENE, C. NKONGE und A. MUSOKE (1998): An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Theileria parva* antibodies in cattle using a recombinant polymorphic immunodominant molecule. Parasitol. Res. 84 (5), S. 408-416

KEATING, K. M., D. B. SEGAL, S. J. CRAIG, A. K. NAULT, V. SEMENSI, A. S. WASSERMAN, C. M. COUNSELL und J. F. BOND (1995): Enhanced immunoreactivity and preferential heterodimer formation of reassociated *Fel d I* recombinant chains. Mol. Immunol. 32 (4), S. 287-293

- KESSLER, E., H.-F. MATTHES, E. SCHEIN und M. WENDT (2003): Detection of antibodies in sera of weaned pigs after contact infection with *Sarcoptes scabiei* var. *suis* and after treatment with an antiparasitic agent by three different indirect ELISAs. Vet. Parasitol. 114 (1), S. 63-73
- KIM, Y. M., H. A. HWANG., W. S. YUN, S. KIM, K. W. LEE, S. K. PARK, Y. J. LEE, T. K. KIM, C. WONGSRICHANALAI, J. A. SAKANARI und H. PARK (2004): Efficacy of the Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium Vivax* as an Antigen for ELISA to Diagnose Malaria. Yonsei Med. J. 45 (1), S. 129-134
- KIMBITA, E. N., X. XUAN, X. HUANG, T. MIYAZAWA, S. FUKUMOTO, M. MISHIMA, H. SUZUKI, C. SUGIMOTO, H. NAGASAWA, K. FUJISAKI, N. SUZUKI, T. MIKAMI und I. IGARASHI (2001): Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. Vet. Parasitol. 102 (1-2), S. 35-44
- KLION, A. D., A. VIJAYKUMAR, T. OEI, B. MARTIN und T. B. NUTMAN (2002): Serum Immunoglobulin G4 Antibodies to the Recombinant Antigen, *LI-SXP-1*, Are Highly Specific for *Loa loa* Infection. J. Infect. Dis. 187 (1), S. 128-33
- KUMARI, S., C. D. LILLIBRIDGE, M. BAKEER, R. C. LOWRIE Jr., K. JAYARAMAN und M. T. PHILIPP (1994): *Brugia malayi*: the diagnostic potential of recombinant excretory/secretory antigens. Exp. Parasitol. 79 (4), S. 489-505
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259), S. 680-685
- LALLI, P. N., M. S. MORGAN und L. G. ARLIAN, (2004): Skewed Th1/Th2 immune response to *Sarcoptes scabiei*. J. Parasitol. 90 (4), S. 711-714

LEE, A. J., J. MACHELL, A. H. M. VAN DEN BROEK, A. J. NISBET, H. R. P. MILLER, R. E. ISAAC und J. F. HUNTLEY (2002): Identification of an antigen from the sheep scab mite, *Psoroptes ovis*, homologous with house dust mite group I allergens. *Parasite Immunol.* 24 (8), S. 413-422

LIGHTOWLERS, M. W. und M. D. RICKARD (1988): Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* 96 Suppl., S. 123-166

LJUNGGREN E. L., D. NILSSON und J. G. MATTSSON (2003): Expressed sequence tag analysis of *Sarcoptes scabiei*. *Parasitology* 127 (2), S. 139-145

LOBOS, E., M. ALTMAN, G. MENGOD, N. WEISS, W. RUDIN und M. KARAM (1990): Identification of an *Onchocerca volvulus* cDNA encoding a low-molecular weight antigen uniquely recognised by onchocerciasis patient sera. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39 (1), S. 135-145

LORENZO, S., F. ROMARÍS, R. IGLESIAS, M. T. AUDÍCANA, J. M. ALONSO, J. LEIRO und F. M. UBEIRA (2000): O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clin. Exp. Allergy* 30 (4), S. 551-559

LOTTSPEICH, F. und H. ZORBAS (1998): Immunologische Techniken. in *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, S. 68-102.

LOWER, K. S., L. M. MEDLEAU, K. HNILICA und B. BIGLER (2001): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in dogs. *Vet. Dermatol.* 12 (6), S. 315-320

LÖWENSTEIN, M., H. KAHLBACHER und R. PESCHKE (2004): On the substantial variation in serological responses in pigs to *Sarcoptes scabiei* var. *suis* using different commercially available indirect enzyme-linked immunosorbant assays. *Parasitol. Res.* 96 (1), S. 24-30

LUCIUS, R., A. KERN, F. SEEGER, T. POGONKA, J. WILLENBUCHER, H. R. TAYLOR, M. PINDER, H. W. GHALIB, H. SCHULZ-KEY und P. SOBOSLAY (1992): Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov33). Trop. Med. Parasitol. 43 (3), S. 139-145

MATTHES, H.-F., K. NÖCKLER und T. HIEPE (1992): Immunreaktionen bei *Sarcoptes*-Infektionen. Nova Acta Leopoldina NF 68 (283), S. 119-129

MATTHES, H.-F., G. B. L. HARRISON, R. J. SHAW, A. C. G. HEATH, A. PFEFFER und T. H. HIEPE (1996): Cross-reacting Antibodies to *Sarcoptes suis*, *Chorioptes bovis* and *Notoedres cati* and anti-*P. ovis* IgE in Sera from Sheep Infested Naturally with *Psoroptes ovis*. Int. J. Parasitol 26 (4), S. 437-444

MATTSSON, J. G., E. L. LJUNGGREN und K. BERGSTRÖM (2000): Paramyosin from the parasitic mite *Sarcoptes scabiei*: cDNA cloning and heterologous expression. Parasitology 122 (5), S. 555-562

MCCARTHY, J. S., D. J. KEMP, S. F. WALTON und B. J. CURRIE (2004): Scabies: more than just an irritation. Postgrad. Med. J. 80 (945): 382-387

MEINKING, T. L., D. TAPLIN, J. L. HERMINDA, R. PARDO und F. A. FRANCISCO (1995): The Treatment of Scabies with Ivermectin. N. Engl. J. Med. 333 (1), S. 26-30

MEINKING, T. L. und G. W. ELGART (2000): Scabies Therapy for the Millennium. Pediatr. Dermatol. 17 (2), S. 154-156

MEIRA, W. S. F., L. M. C. GALVAO, E. D. GONTIJO, G. L. L. MACHADO-COELHO, K. A. NORRIS und E. CHIARI (2002): *Trypanosoma cruzi* Recombinant Complement Regulatory Protein: a Novel Antigen for Use in an Enzyme-Linked Immunosorbant Assay for Diagnosis of Chagas' Disease. J. Clin. Microbiol. 40 (10), S. 3735-3740

MELLANBY, K. (1944): The development of symptoms, parasitic infestation and immunity in human scabies. Parasitology 35, S. 197-206

MIGNONE, F., C. GISSI, S. LIUNI und G. PESOLE (2002): Untranslated regions of mRNA. *Genome Biol.* 3 (3), S. 1-10

MOLINARI, J. L., E. GARCÍA-MENDOZA, Y. DE LA GARZA, J. A. RAMÍREZ, J. SOTELO und P. TATO (2002): Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (6), S. 777-781

MORGAN, M. S., L. G. ARLIAN und S. A. ESTES (1997): Skin test and radioallergosorbent test characteristics of scabietic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57 (2), S. 190-196

MORSY, G. H. und S. M. GAAFAR (1989): Responses of immunoglobulin-secreting cells in the skin of pigs during *Sarcoptes scabiei* infestation. *Vet. Parasitol.* 33 (2), S. 165-175

MULLIS, R. B. und F. A. FALOONA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, S. 335-350

NAGANO, I., F. PEI, Z. WU, J. WU, H. CUI, T. BOONMARS und Y. TAKAHASHI (2004): Molecular Expression of a Cysteine Proteinase of *Clonorchis sinensis* and Its Application to an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Immunodiagnosis of Clonorchiasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11 (2), S. 411-416

NDE, P. N., T. POGONKA, J. E. BRADLEY, V. P. K. TITANJI und R. LUCIUS (2002): Sensitive and specific serodiagnosis of Onchocerciasis with recombinant hybrid proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (5), S. 566-571

NIELSEN, H. und A. KROGH (1998): Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6, S. 122-130

NIEUWLAND, M. G. B., H. W. PLOEGER, A. KLOOSTERMAN und H. K. PARMENTIER (1995): Systematic antibody responses of calves to low molecular weight *Cooperia oncophora* antigens. Vet. Parasitol. 59 (3-4), S. 231-239

NISHIYAMA, C., T. YASUHARA, T. YUKI und Y. OKUMURA (1997): Recombinant *Der f III* allergen and its production. Patent: JP 1997040583-A 1  
Asahi Breweries LTD, Torii Yakuhin KK, Nikka Uisukii KK

NSOSO, S. J., K. P. MOSALA, R. T. NDEBELE und S. S. RAMABU (2000): The prevalence of internal and external parasites in pigs of different ages and sexes in Southeast District, Botswana. Onderstepoort J. Vet. Res. 67 (3), S. 217-220

OLEAGA-PEREZ, A., R. PEREZ-SANCHEZ, A. ASTIGARRAGA und A. ENCINAS-GRANDES (1994): Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. Vet. Parasitol. 52 (1-2), S. 97-111

OKANO, M., A. R. SATOSKAR, K. NISHIZAKI, M. ABE und D. A. HARN, jr. (1999): Induction of Th2 Responses and IgE is Largely Due to Carbohydrates Functioning as Adjuvants on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens.  
J. Immunol. 163 (15), S. 6712-6717

PERMIN, A., L. YELIFARI, P. BLOCH, N. STEENHARD, N. P. HANSEN und P. NANSEN (1999): Parasites in cross-bred pigs in the Upper East Region of Ghana. Vet. Parasitol. 87 (1), S. 63-71

PETERS, N. T., J. A. ROHRBACH, B. A. ZALEWSKI, C. M. BYRKETT und J. C. VAUGHN (2003): RNA editing and regulation of *Drosophila 4f-rnp* expression by *sas-10* antisense readthrough mRNA transcripts. RNA 9 (6), S. 698-710

RALSTON, M. J. und D. D. HEATH (1995): A defined antigen for the serodiagnosis of *Taenia ovis* infections in dogs. J. Parasitol. 81 (3), S. 422-428

- RAMACHANDRAN, S., R. W. THOMPSON, A. A. GAM und F. A. NEVA (1998): Recombinant cDNA Clones for Immunodiagnosis of Strongyloidiasis. J. Infect. Dis. 177 (1), S. 196-203
- RAWLINGS, N. D. und A. J. BARRETT (1994): Families of serine peptidases. Meth. Enzymol. 244, S. 19-61
- REHBEIN, S., M. VISSER, R. WINTER, B. TROMMER, H.-F. MATTHES, A. E. MACIEL und S. E. MARLEY (2003): Productivity effects of bovine mange and control with ivermectin. Vet. Parasitol. 114 (4), S. 267-284
- ROBERT-KOCH-INSTITUT (2000): Krätzmilbenbefall (Skabies) - Erkennung, Behandlung und Verhütung. Merkblatt für Ärzte. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2000, Springer Verlag 43 , S. 550-554
- ROOS, T. C., M. ALAM, S. ROOS, H. F. MERK und D. R. BICKERS (2001): Pharmacotherapy of ectoparasitic infections. Drugs 61 (8), S. 1067-1088
- RUETER, S. M., T. R. DAWSON und R. B. EMESON (1999): Regulation of alternative splicing by RNA editing. Nature 399 (6731), S. 75-79
- SALOTRA, P., G. SREENIVAS, A. A. NASIM, B. V. SUBBA RAJU und V. RAMESH (2002): Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbant Assay for Diagnosis of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis with Crude or Recombinant k39 Antigen. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9 (2), S. 370-373
- SANDEMAN, R. M., M. ZALUNARDO und C. F. CARGILL (2001): Patentschrift: PCT/AU00/00930, Internationale Publ. Nr.: WO 01/11365 A1
- SANGER, F., S. NICKLEN und A. R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (12), S. 5463-5467



SCHEIBLHOFFER, S., D. CHEN, R. WEISS, F. KHAN, S. MOSTBÖCK, K. FEGEDING, W. W. LEITNER, J. THALHAMER und J. A. LYON (2001): Removal of the circumsporozoite protein (CSP) glycosylphosphatidylinositol signal sequence from a CSP DNA vaccine enhances induction of CSP-specific Th2 type immune responses and improves protection against malaria infection.

Eur. J. Immunol. 31 (3), S. 6992-698

SCHNIEDER, T. (1992): Use of recombinant *Dictyocaulus viviparus* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of bovine dictyocaulosis. Parasitol. Res. 78 (4), S. 298-302

SCHOFIELD, L. (1991): On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. Parasitol. Today 7 (5), S. 99-105

SEMENOV, E. P. und W. L. PAK (1999): Diversification of *Drosophila* Chloride Channel Gene by Multiple Posttranscriptional mRNA Modifications.

J. Neurochem. 72 (1), S. 66-72

SKERRATT, L. F., N. J. H. CAMPELL, A. MURELL, S. WALTON, D. KEMP und S. C. BARKER (2002): The mitochondrial 12S gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and humans in Australia.

Parasitol. Res. 88 (4), S. 376-379

SMETS, K. und J. VERCRUYSSSE (2000): Evaluation of different methods for the diagnosis of scabies in swine. Vet. Parasitol. 90 (1-2), S. 137-145

SOMMER, A., M. NIMITZ, H. S. CONRADT, N. BRATTIG, K. BOETTCHER, P. FISCHER, R. D. WALTER und E. LIEBAU (2001): Structural Analysis and Antibody Response to the Extracellular Glutathione S-Transferases from *Onchocerca volvulus*. Infect. Immun. 69 (12), S. 7718-7728

STEMMER, B. L., L. G. ARLIAN, M. S. MORGAN, C. M. RAPP und P. F. MOORE (1996): Characterization of antigen presenting cells and T-cells in progressing scabietic skin lesions. *Vet. Parasitol.* 67 (3-4), S. 247-258

TAUSCH, I. (1999): Crotamiton-eine wirksame und sichere Substanz für die Therapie der Skabies, Ergebnisse einer kontrollierten klinischen Prüfung. *Z. Hautkr.*, 3 (74), S. 162-167

TAWILL, S., L. LE GOFF, F. ALI, M. BLAXTER und J. E. ALLEN (2004): Both Free-living and Parasitic Nematodes Induce a Characteristic Th2 Response That Is Dependent on the Presence of Intact Glycans. *Infect. Immun.* 72 (1), S. 398-407

TELLAM, R. L., C. H. EISEMANN, T. VUOCOLO, R. CASU, J. JARMEY, V. BOWLES und R. PEARSON (2001): Role of oligosaccharides in the immune response of sheep vaccinated with *Lucilia cuprina* larval glycoprotein, peritrophin-95. *Int. J. Parasitol.* 31 (8), S. 798-809

VIRGINIO, V. G., A. HERNÁNDEZ, M. B. ROTT, K. M. MONTEIRO, A. F. ZANDONEI, A. NIETO, A. ZAHA und H. B. FERREIRA (2003): A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol.* 132 (2), S. 309-315

WALLGREN, P. und S. BORNSTEIN (1997). The spread of porcine sarcoptic mange during the fattening period revealed by development of antibodies to *Sarcoptes scabiei*. *Vet. Parasitol.* 73 (3-4), S. 3135-324

WALLIS, A. E. und W. R. MCMASTER (1987): Identification of *Leishmania* genes encoding proteins containing tandemly repeating peptides. *J. Exp. Med.* 166 (6), S. 1814-1824

WALTON, S. F., B. J. CURRIE und D. J. KEMP (1997): A DNA fingerprinting system for the ectoparasite *Sarcoptes scabiei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85 (2), S. 187-196

WALTON, S. F., M. R. MYERSCOUGH und B. J. CURRIE (2000): Studies in vitro on the relative efficacy of current acaricides for *Sarcoptes scabiei* var. *hominis*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94 (1), S. 92-96

WALTON, S. F., A. DOUGALL, S. PIZZUTTO, D. HOLT, D. TAPLIN, L. G. ARLIAN, M. MORGAN, B. J. CURRIE und D. J. KEMP (2004): Genetic epidemiology of *Sarcoptes scabiei* (Acari: Sarcoptidae) in northern Australia. Int. J. Parasitol. 34 (7), S. 839-849

WELLENREUTHER, R., I. SCHUPP, THE GERMAN cDNA CONSORTIUM, A. POUSTKA und S. WIEMANN (2004): SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones. BMC Genomics 5 (1): 36, online Publikation

WENDEL, K. und A. ROMPALO (2002): Scabies and Pediculosis Pubis: An Update of Treatment Regimens and General Review. Clin. Infect. Dis. 35 (2), S. 146-51

WILLIAMSON, K. C., H. FUJIOKA, M. AIKAWA und D. C. KASLOW (1996): Stage-specific processing of PFS230, a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidate. Mol. Biochem. Parasitol. 78 (1-2), S. 161-169

YAMASAKI, H., K. ARAKI, P. K. C. LIM, N. ZASMY, J. W. MAK, R. TAIB und T. AOKI (2000): Development of a Highly Specific Recombinant *Toxocara canis* Second-Stage Larva Excretory-Secretory Antigen for Immunodiagnosis of Human Toxocariasis. J. Clin. Microbiol. 38 (4), S. 1409-1413

ZAHLER M., A. ESSIG, R. GOTHE und H. RINDER (1999): Molecular analyses suggest monospecificity of the genus *Sarcoptes* (Acari: Sarcoptidae). Int. J. Parasitol. 29 (5), S. 759-766

---

ZANG, X., A. K. ATMADJA, P. GRAY, J. E. ALLEN, C. A. GRAY, R. A. LAWRENCE, M. YAZDANBAKHSI und R. M. MAIZELS (2000): The Serpin Secreted by *Brugia malayi* Microfilariae, BM-SPN-2, Elicits Strong, but Short-Lived, Immune Responses in Mice and Humans. J. Immunol. 165 (9), S. 5161-5169.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ag	Antigen
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	bicinchoninic acid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumine
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
dest.	destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Dpt</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EST	expressed sequence tag
F	forward
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gDNA	genomische DNA
G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
H + L	heavy and light chain
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
LB	Luriani-Bertani-Broth
L3	drittes Larvenstadium
MCS	Multiple Cloning Side
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Molekulargewicht
NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
pfu	plaque forming unit
PCR	polymerase chain reaction
POX	horseradish peroxidase
R	reverse
red.	reduziert
RT	Raumtemperatur
<i>Ss</i>	<i>Sarcoptes scabiei</i>
T	Thymin
$T_m$	Schmelztemperatur
TPI	Triosephosphatisomerase

---

U	unit
UTR	untranslated region
ü/N	über Nacht
W	Watt

## 7.2 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

## 7.3 Buchstabencode mehrdeutiger Nukleotide (Wobbles)

M	A/C
R	A/G
W	A/T
S	G/C
Y	C/T
K	G/T
V	A/C/G
H	A/C/T
D	A/G/T
B	C/G/T
N	A/C/G/T

## 7.4 Sequenzen der charakterisierten Klone

### 7.4.1 Klon Ss-4

5'CGGGGAGATCCGATTGAAATCATTGCGTTACGTTACGAATCCAATCAGCTATCGAAGCTATCGTTCAGAAAAG  
 TTTCAATCGCACTATCGATTATAGATTGAAA<sup>Start</sup>ATGAAATACGATTTTCAGTGGTAAAGTTGCGTTGGTTACGGGTTC  
 M K Y D F S G K V A L V T G S  
 CAGTTCTGGAATTGGTGCAGCTATCGCATTACAATTTGCACAATATGGTGCAAAAGTTTGCATCACTGGACGTGA  
 S S G I G A A I A L Q F A Q Y G A K V C I T G R D  
 TTCGAACGCGTTGGAAGGTCGCCGGTGAGATTGAGAAAGCTACTGGTGGTAAACATCGACCATTGAAGATCAT  
 S N A L E K V A G E I E K A T G G K H R P L K I I  
 CGGTGGTCTAGTCGAAGATCGTCAGCTTCCGGTTCGTTTGTATCAACGAGACTGTCAACGAATTCGGTAGGCTCGA  
 G G L V E D R Q L P V R L I N E T V N E F G R L D  
 TTTTTTGGTCAACAATGCTGGTGGTTCAACAGCCCATGGCAAATTGACCGATGAGAATCTTATGGATAGCTATGA  
 F L V N N A G G S T A H G K L T D E N L M D S Y D  
 TAAGGTCTTCGATCTTAATGTTTCGATCGGTTCTCCATCTATGTCAAGTGGCAAAACCTCATCTGGAGAAAACCAA  
 K V F D L N V R S V L H L C Q V A K P H L E K T K  
 GGGGAACATAATCAATATCTCTAGCATTGCTGCAATCGTACCATATTCTTTGATCTATTCTCCAAGCAAAGCAGC  
 G N I I N I S S I A A I V P Y S L I Y S P S K A A  
 TTTAGATATGATGACTAAATGCTTAGCGATCGAGTATGGAGACATAGGAGTTCGAGTGAATAGCATCAATCCTGG  
 L D M M T K C L A I E Y G D I G V R V N S I N P G  
 ACCAGTACGGACAGGTTTTCTTCGATCAATGGGAATGCAAATGGATAATTATGATGAGCTGTATGATCGATACAG  
 P V R T G F L R S M G M Q M D N Y D E L Y D R Y S  
 CTCCAATACATTGCTAAATTTTGTACCGTACGGTGACGAAATTGCTAATCTAGCATCATTTTGTAGCATCAGACGA  
 S N T L L N F V P Y G D E I A N L A S F L A S D D  
 TGCTAAAAACTTGACCGGTTCAATTGTTGTAAGCGATACTGGATGTATGTTGATGAAACCAAAAATCGAAATGCG  
 A K N L T G S I V V S D T G C M L M K P K I E M R  
 ACAGTCCGATAACAA<sup>Stop</sup>TAATTTCAATACCTTATTTTTGTATGAAATTTCAACTACCTTTCGAATTATTTCTCTCG  
 Q S D N K \*  
 TATCTGAGTGAATTCGATATAAGAATGTTCAAAAAATTATATTAAACAAGCTTCTCCTACTTTTACCA<sup>Poly-A</sup>AAAAA  
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'





### 7.4.3 Klon Ss-14

5' TACGGCCGTTGGGGCTGATTCTTGGCTAATGAATTTGATTCAATCAGTGTGATGAATTTTTCAGCGATAC  
L I L A N E F D S F Q S D V D E F Q R Y  
AGTTTGAGAGATTTTATTTATCAAAATGCGCTCAATAATTTGATTGACGATCCTGCTCCGAATAATCCTGATGAC  
S L R D F I Y Q N A L N N L I D D P A P N N P D D  
AAAGATAAAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAGGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAA  
K D K E K E K K E R E E K E K K E K E E K E K K E  
AAGGAGAAAAAAGACAAGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAG  
K E K K D K E E K E K K E K E E K E K K E K E E K  
GAGAAGAAGGAAAAGGAGAAAAAAGACAAGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGAGAAGAAGGAG  
E K K E K E K K D K E E K E K K E K E E K E K K E  
AGAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAA  
R E E K E K K E K E E K E K K E K E E K E K K E K  
GAAGAAAAAGACAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGACAAGAAGGAAAAAGGAA  
E E K D K K E K E E K E K K E K E E K D K K E K E  
GAAAAAGACAAGAAGGAAAAGGAAGAAAAGGATAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGACAAAGACAAAAAAGAGAC  
E K D K K E K E E K D K K E K E E K D K D K K E D  
GATGAAGAGGCTGAAATGAAAAAAGAACTCCAGAAGCTAATAGAAGAAGGCGAAAAAGCTTCGGAAAAAGCGCAT  
D E E A E M K K E L Q K L I E E G E K A S E K A H  
GAAAAACTTCACCAAAGTAACATCAATATGTACTCGATGGTGTTCACCCAAGAACTAGAATATATGGAATGTTG  
E K L H Q S N I N M Y S M V F T Q E L E Y M E M L  
GTCCGTCGGTGTAAGCTTATTTGACGAAATTACCGAATCCATTTCTACGAAAAATGATTCTCTATGCTGTCAGG  
V R R C K A Y L T K L P N P F L R K M I L Y A V R  
GATCTAAGATCTATGTTAATCTTCATGAAAAATTTGCAGCAAATGTATAATGAAGGACAAGATCCTTCTATGCCA  
D L R S M L I F M K N L Q Q M Y N E G Q D P S M P  
ACGTTAACGAGATTGATTAGAGAAGTGATCGAGCAAGCGAATCTGGATGTCATCTATCTCACTTCGATCAACTGC  
T L T R L I R E V I E Q A N L D V I Y L T S I N C  
AGAGGTGATGCTGGTAAAAATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

#### 7.4.4 Klon Ss-17

CGGGGGATAGATTTCTGTGATTCTGATTGCTTCGTTATTTCCAATCAAAGTCTAGAAGAAAGATGAATTTTTTCC  
Start  
M N F F  
ATTGTCTTTTGTCTATTGATTGCTGGTGGTCTTATTGAGGCCTATGTCGTCGATCAGAAAGCTCAAAATGATTGTA  
H C L L L L I A G G L I E A Y V V D Q K A Q N D C  
GACAAATTCATCATTGTGATGTGGATACGAACGGAACCTATTATAGTGAAAACGGATGTCATCTGACGTGCTGCC  
R Q I H H C D V D T N G T H Y S E N G C H L T C C  
TACATGGACATGAATATCATCATGCAATGAACGAAAACCAAATTTGTTTGGTTGGTAATGGTGCTTGGCACTGTA  
L H G H E Y H H A M N E N Q I C L V G N G A W H C  
AAAAAGGCCACTGTATTCCTACAGAAAATTTAGGTTACATCGATGTTGAAATCATCTCGGCGGCACTTTCTCGGC  
K K G H C I P T E N L G Y I D V E I I S A A L S R  
CAGCGAACGCTTATGCGACTGTTTGTCTCCAGAACAATACCGATCCAGTACCGCTACCGATTGAGATCGCTCTA  
P A N A Y A T V C L Q N N T D P V P L P I R D R S  
AATGTATACAGTGTTCACCCAAGTTAAACCGCACACCGCGAGGCCAGTTTGGCATCAAATCTGCCGAGGCTCGG  
K C I Q C S T Q V K P H T A R P V W H Q I C R G S  
GAAAATACATTTTTTCGTAAGAACTCTCGCGTCACTTTTGAAGTTTGGGATTATCAGGGCTCCCAAATTCCTAACG  
G K Y I F R K N S R V T F E V W D Y Q G S Q I P N  
TTTTCTTGGGTGGATCAACCCTAACTATCAAAAACTTTTAGAGTTCGGTGATAGTGGTCGTGCGATTAATATGG  
V F L G G S T L T I K K L L E F G D S G R A I N M  
CCTTGTTTGGCAGTCCATTTTCGAGGACAACCTGACCGGCAGAATAACATGGACTCCACTTAAAAAATGATAACATC  
Stop  
A L F G S P F R G Q L T G R I T W T P L K K \*  
AGAATTTTATTGATTTAATTGTTTCGATTTATTTTCGATAATATTATAGAACTATGCAAAATAGTTTGTGCGTATT  
Poly-A  
TGAGAAAAGATTTATTGCGAATATCTAAAAAAGAATCGATTAATTTAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAA 3'

### 7.4.5 Klon Ss-18

5'CTTACGGCCGGGGATTCTGGCTAATGAATTTGATTTCATTTCAATCAGATGTTGATGAATTTTCAGCGATACAGT  
I L A N E F D S F Q S D V D E F Q R Y S  
TTGAGAGATTTTATTTATCAAAATGCGCTCAATAATTTGATTGACGATCCCGCTCCGAATAATCCTGATGACAAA  
L R D F I Y Q N A L N N L I D D P A P N N P D D K  
GATAAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAGGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAAAGGAGAAGAAGGAAAAG  
D K E K E K K E R E E K E K K E K E E K E K K E K  
GAGAAAAAGACAAGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAAAGGAG  
E K K D K E E K E K K E K E E K E K K E K E E K E  
AAGAAGGAAAAGGAGAAAAAGACAAGGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAA  
K K E K E K K D K E E K E K K E K E E K E K K E K  
GAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGAGAAGAAGGAGAAAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAA  
E E K E K K E K E E K E K K E K E E K E K K E K E  
GAAAAAGACAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGAGAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGACAAGAAGGAAAAGGAAGAA  
E K D K K E K E E K E K K E K E E K D K K E K E E  
AAAGACAAGAAGGAAAAGGAAGAAAAGGATAAGAAGGAGAAAAGAAGAAAAGGACAAAAGCAAAAAAGAACGAT  
K D K K E K E E K D K K E K E E K D K D K K E D D  
GAAAAGGCTGGGGAAAAGGCAAAGGAAAAGGTCATGGCGAAGGTGAAGGCGAAGGAGT<sup>Stop</sup>AGGAGAAAGTAATGGAA  
E K A G E K A K E K V M A K V K A K E \*  
AAGGCTGGGGAAAAGGCAAAGGCAAAGGTGATGGAGAAGGCGAAGGAGAAGGAGTAGGCGAAGGCAAAGGCCAAG  
GTGGAGATGATGAAGATGAAGGAGAAGGCCAAGGTGGAGAAGGAGGAAAAGGCAAG<sup>Poly-A</sup>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAA 3'

### 7.4.6 Klon Ss-23

5´ACCGAAATGTTGATGATTTGATTTTAAATCATTACTGAGTGGTTTGGTCTCTAGATTTCAACATGCGAATTCT  
TTTTCATCTTGTCTAGACATCTTGAAAAGTTCAGATTTATACAATAATCTTCTTGAAGTTTCTATAGATATTCTT  
GACAACTAACTCTTGTTAGTATA<sup>Start</sup>AATGATTCGTTTCTCAGTGCTATTTTGTGGTCTTTTGTGCTACGATCTATT  
M I R F S V L F L L V F C A T I Y  
TGATCGATGCTAAAGGTGTTTCGATAAATCCTGGGGGAAAACCTGGAGGAAAACATGTAGGTAAATCTCACCGTG  
L I D A K G V S I N P G G K P G G K H V G K S H R  
GGACACCTTTTGGCAAACGATTAGGAGGTGGACACGAGCCTAAACCTCATACGAAGCCTAAATCAAAACCCAAAC  
G T P F G K R L G G G H E P K P H T K P K S K P K  
CCAAACCTCCTAAACCACATCCTAAGAAGCATCATGGAAAACCATCTAAACCTTCTCCAAAGAAGCCAGGACACA  
P K P P K P H P K K H H G K P S K P S P K K P G H  
GACCCGGACATAAGCCTGCACATAAACCTCGTAAACCAGTTCATAAGAAGCATCATAAAAAATCCCCTAAACCTA  
R P G H K P A H K P R K P V H K K H H K K S P K P  
AGCGTAAGAAGCCAGGACACAGACCCGGACATAAGCCTGCACATAAACCTCGAAAACCAGTTCATAAGAAGCATC  
K R K K P G H R P G H K P A H K P R K P V H K K H  
ATAAAAAATCCCCTAAACCTAAGCGTAAGAAGCCAGGGCACAAACCACGTAAACCGAATCCTAAGAAGCATCATG  
H K K S P K P K R K K P G H K P R K P N P K K H H  
GAAAACCATCTAAACCTTCTCATAGAAAAGTCTGGACACCGTAAACCTGGTCACAAAAAGCCAGGACGTAAACATG  
G K P S K P S H R K S G H R K P G H K K P G R K H  
GAAAAATAAGAAGGAATCGG<sup>Poly-A</sup>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3´  
G K N K K E S E K K K K K K K

### 7.4.7 Klon Ss-37

5'GCATGCGAGCTCGGTACCATACTTTCTTCACTTTTGTGTGTAACCGCAGCTTCCTGTGTTCAAAATAAGAAAAA  
M R A R Y H T F F T F V V T A A S C V Q N K K K  
AGAAGAAATTATGGTTCATTATGGATCCGCGAATCGAACAATTGGAGGTTATAATACCACTGTCAAAAACATCTT  
E E I M V H Y G S A N R T I G G Y N T T V K N I F  
CATAAATGAGCATTATGATAATAGCACGATGCATTCAAACATCGCTTTGCTTGAAACCGATGAGATGACGCTTGA  
I N E H Y D N S T M H S N I A L L E T D E M T L D  
TAACTTAACAAGCAAAGCAATCGAATTACCCCTCGCTCAGTCTGAACCACCCATTGGCACTTGGGTGTTAGTTTC  
N L T S K A I E L P L A Q S E P P I G T W V L V S  
GGGTTGGGGTGGAAATGACGAAAGAATCATACTCTGATGTTTTGAGAAAGGCCTTTTCAATGTCAAGGATCCAGA  
G W G G M T K E S Y S D V L R K A F F N V K D P D  
TCAATGTAAACATCAACTAAGACACATACCCCAACTACATCAGAAGAGTTCTGTGCAAATACAAACGTCAGTCT  
Q C K T S T K T H T P T T S E E F C A N T N V S L  
AGAAACAGGTGATGAGGGAGATCCAGCTGTTCAACGCTAGATTAGTAGGACTTGGTCCATACCCCTCCTTCGAA  
E T G D E G D P A V H N A R L V G L G P Y P P S N  
CCCTGATTATCCGAGCGTTTTACCCAGAGTTGGAGCTTTTATGGGGTGGATACAAAGCGTCATACATAAAAAATGG  
P D Y P S V F T R V G A F M G W I Q S V I H K N G  
CGAGAGT<sup>stop</sup>TAATTCATTTCAATGAAAATTATCCATCTCATTTGAATGATGTGCGATGAACTTGTGATAGCCCTATCT  
E S \*  
GATCTAAATAGATTTTCATGTGACAAGATTCTAAGTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'  
Poly-A

### 7.4.8 Klon Ss-97

5'CTTCGATTTTCATTAGCAAATAGCAAATTATTTGTGATAAAATCATTGGATCAACCAAATCACTAACTAATATTC  
 GATAGTGATAGATTGAAAACAACTCAATCTAATCTCAAAATGAAATTAATCTGTCTTTTCATCGGATTACTGGT  
 M K L L C L F I G L L V  
 CTTCGTCATCAGTATCCATCTCTGTCTGTCCAAAAAGAAGATAAGGAGCTAAGAAGTGAACATATATAAATCACAACCT  
 F V I S I H L S V Q K E D K E L R S E L Y K S Q L  
 ATCTCCCACTCAAATGACATGAATAACAATCACAATCTAACTAAGATGTGGTGGATCGAAAGGTACAGATAA  
 S P T Q N D M N N N H K S K L R C G G S K G T D K  
 ACGTCATCGAAGATGTCGACATCGACGATACAGACACCGATATTATTACAGACGCTACTATTATAGAAGATATAT  
 R H R R C R H R R Y R H R Y Y Y R R Y Y Y R R Y I  
 ATACAAAAGAGGAGGTCCAAATGGAAGAGGCATGCGAAGAGGAGGCATGAGAGGAAGAAATGGCATGGGAAAAGG  
 Y K R G G P N G R G M R R G G M R G R N G M G K G  
 AAGAGGTAAAGGCAAAGGCCAAGGTGAAGGCGAAGGAGAGGGAGAAGGCGAAGGTGAAGGCAAAGGCTGGGGAAA  
 R G K G K G Q G E G E G E G E G E G E G K G W G K  
 AGGCAAAGGCAAAGGCCATGGTGAAGGCGAAGGCGAAGGGACAGGAGAAAGTAATGGAAAAGGCTGGGGAAGAGG  
 G K G K G H G E G E G E G T G E S N G K G W G R G  
 CAAAGGCAAAGGCAAAGGTCATGGCGAAGGCGAGGGAGAAGGCGAAGGTGAAGGAAGCAGCAATGGAAAAGGCTG  
 K G K G K G H G E G E G E G E G E G S S N G K G W  
 GGGAAAAGGCTGGGGAAAAGGGCAAAGGTAAAGGTCATGGCGAAGGTGAAGGCGAAGGAGTAGGAGAAAAGTAATGG  
 G K G W G K G K G K G H G E G E G E G V G E S N G  
 AAAAGGCTGGGGAAAAGGCAAAGGCAAAGGTGATGGAGAAGGCGAAGGAGAAGGAGTAGGCGAAGGCAAAGGCCA  
 K G W G K G K G K G D G E G E G E G V G E G K G Q  
 AGGTGGAGATGATGAAGATGAAGGAGAAGGCCAAGGTGGAGAAGGAGGAAAAAGGCAAAGGAAAAAGGTCCCGGTGA  
 G G D D E D E G E G Q G G E G G K G K G K G P G E  
 AGGCGAAGGAGAAGGAGAAGGAGTAGGCGAAGGAGGAGCAGGAGGAAAAGGCAAGGGAAAAGGCCAAGGCAAAGG  
 G E G E G E G V G E G G A G G K G K G K G Q G K G  
 CAAAGGCAAAGGTGAAGGTGAAGGTGAAGGCGAATGGGAGGAAAAGGCAAAGGTAGAGGGAAAAGGAAAAGGCGT  
 K G K G E G E G E G G M G G K G K G R G K G K G V  
 AGGCGAAGGTGAAGGTGAAGGCGAAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'  
 G E G E G E G E G K K K K K K K K K

### 7.4.9 Klon Ss-134

5´ATTTACGATTTTGACTATCAATCCTCGTAACAATACGATCACCGAATCAAAATGAGATTTCTCTTGATTGCTT  
 GTTTCTCTGTTTTGGTCGCCTCAAATGTATCGGCCAACTATAACTTTCACTTGCCTCTCAAATTAGGAGGCTTGC  
 TTGGCGGCAACTCAATGAACGGCCTGCAAGGAGGAATGGGTGGTCAACAAGGAAGTTTCGGAGGAATGGGAGGTC  
 AGCAAGGAGGAATGAATGGTCAACAAGGAGGTTCTGGAGGAATGGGTGGTCAAGCAAGGACTTTACGGAGGAATTG  
 GTGGTCAACAAGGAGGAATGA<sup>Start</sup>TGGTCAGCAAGGAGGAATGGGGTAGTCAACAAGGAGGTCAAGAAGTGACAATT  
 M V S K E E W G S Q Q G G Q E V T I  
 GTGCAAACAGGAAATAC'TTTTGATGGTCAAGATTTAATGGTGGGTCAACAAGGTCTCGGTGGTCAACAAGGAATG  
 V Q T G N T F D G Q D L M V G Q Q G L G G Q Q G M  
 ATGGGTCAACAAGGATATGGTGGCCAACAAGGAATGATGGGTCAACAAGGTTTGGCGGTCAACAAGGTTTCGGT  
 M G Q Q G Y G G Q Q G M M G Q Q G F G G Q Q G F G  
 GGTCAACAAGGAATGATGGGACAACAAGGTTTGGCGGTCAACAAGGAATGATGGGACAACAAGGTCTCAGTGGT  
 G Q Q G M M G Q Q G F G G Q Q G M M G Q Q G L S G  
 CAGCAAGGAATGATGGGTCAACAAGGTTTGGCGGTCAACAAGGAGCCGTAATCAACAAGGAATGATGGGACAA  
 Q Q G M M G Q Q G F G G Q Q G A G N Q Q G M M G Q  
 GGTCTGGTGGACAAGGAGGATCTTCAGGCCAAAATGGATTTCCCGGTTTCGGCATTCAAGGATTATTTGGTCTT  
 G S G G Q G G S S G Q N G F P G F G I Q G L F G L  
 TTAGGAATCAAAAACGGTTTGGATATGGTTTCGGTCAAGGAAGCGGTTTGGCCAAGGCAATGGCTTCGGTCAA  
 L G I K N G F G Y G F G Q G S G F G Q G N G F G Q  
 GGAAACGGTTTGGCCAAGGCAATGGCTTCGGTCAAGGAAACGGTTTGGCCAAGGCAGTGGCTTCGGACAAGGA  
 G N G F G Q G N G F G Q G N G F G Q G S G F G Q G  
 AATGGTATGAGCCAAGGCAATAGTCTCGGTCAAGGAAACGGTTTGGGACAAGGCAGTGGCTTCGGACAAGGAAAC  
 N G M S Q G N S L G Q G N G L G Q G S G F G Q G N  
 GGTAATGCCCAAGGCAATGGT'TTTGGTCAAGGAAACGGTTTGGCCAAGGCAACGGTTTCGGACAAGGAAACGGT  
 G N A Q G N G F G Q G N G F G Q G N G F G Q G N G  
 AATGGACAAGGCAGCGGTTCTGGACAAGGCAACAATTTGGGTTTGGAAAATACTTGCCGTGTCGTCTACAGTTTG  
 N G Q G S G S G Q G N N L G L E N T C R V V Y S L  
 GAAGCAATGAGAAATCGCGCTTTACAACCATTTGGAGACTGCTCGACGAAGTTGCAATGCTGCCTTTAATTTGGAA  
 E A M R N R A L Q P L E T A R R S C N A A F N L E  
 CGATTGGTCAACAATTGAATGCTGTGTTGGCAAATCTTGCCCCATACAGNGGAAGATGCGCTTATGGTCCCTTCA  
 R L V E Q L N A V L A N L A P Y X G R C A Y G P S  
 CAGTATTGGCTCCGAGCTATTGGAAGCAAATAG<sup>Stop</sup>ACTTGATTAATTTGTAGTGAAATCATTTTATTAAATGATTC  
 Q Y W L R A I G S K \*  
 CAATAAAAATGATTTGGAAT<sup>Poly-A</sup>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3´

### 7.4.10 GA-Sonde

5´ATTCATTTCAATCAGATGTTGATGAATTTCAAGCGATACAGTTTGAGAGATTTTATTTATCAAAATGCGCTCAA  
 TAATTTGATTGACGATCCTGCTCCGAATAATCCTGATGACAAAGATAAAAAAAGGAGAAGAAGGAGAGGGAAGA  
 AAAGGAGAAGAAGG 3´



## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Richard Lucius für die Aufnahme in seinen Lehrstuhl und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken. Sein großes Interesse und Ideenreichtum sowie die gute Betreuung haben diese Arbeit immer wieder weitergebracht.

Dr. Bernd Kalinna danke ich sehr für die Aufnahme in sein Labor, seine Unterstützung und die ständige Bereitschaft, sich mit meiner Thematik auseinanderzusetzen. Ich habe sehr gern mit ihm zusammengearbeitet.

Von ganzem Herzen danke ich Grit Meusel für ihren bedingungslosen Einsatz in diese Arbeit. Ohne ihre Klonierungskünste und anderen Laborfertigkeiten sowie ihren Humor hätte diese Arbeit nicht in der Zeit und nur mit halb so viel Freude fertiggestellt werden können.

Smitha Pillai ist genau zum richtigen Zeitpunkt in dieses Labor gekommen. Es hat mir sehr viel Spaß bereitet, mit ihr zusammen zu arbeiten und ich freue mich darüber, dass wir uns kennengelernt haben.

PD Dr. Wilfried Bleiß und Anorte Marko haben große Mühe und Arbeit in die histologischen Schnitte und elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Milben gesteckt.

Dr. Anna Walduck hat mir sehr durch ihre große Unterstützung bei den immunhistochemischen Arbeiten geholfen.

Bei Prof. W. Höhne und Dr. R. Volkmer-Engert bedanke ich mich für die Hilfe bei der Auswahl und Synthese der Peptide.

Für große Unterstützung und Spaß bei der Arbeit haben immer wieder Bettina Reich, PD Dr. Susanne Hartmann, Dr. Thomas Pogonka, Marion Müller, Bettina Sonnenburg, Sebastian Rausch, Chris Klotz, Karin Biermann sowie alle anderen Doktoranden und Diplomanden gesorgt. Ganz besonders habe ich mich natürlich auch über die großzügigen Blutspenden gefreut!

Dr. Matthes und Dr. Rehbein haben mir ständig neues Arbeitsmaterial bereitgestellt. Ohne ihre Hilfe hätten einige Versuche nicht durchgeführt werden können.

Meinem Mann Mathias danke ich für all seine Unterstützung und Geduld in dieser Zeit.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgenden Veranstaltungen präsentiert oder für die Publikation vorbereitet:

**Vorträge:**

„Charakterisierung rekombinanter Antigene für die Diagnostik von *Sarcoptes scabiei* Infektionen“

1. Studententag der Lebenswissenschaften Mitte

Berlin, 19. Juni 2002

3. Preis

“Characterisation of recombinant immunreactive antigens from the scab mite *Sarcoptes scabiei*”

The 19th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)

New Orleans, 10.-14. August 2003

“Characterisation of recombinant immunreactive antigens from the scab mite *Sarcoptes scabiei*”

21. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)

Würzburg, 17.-20. März 2004

**Posterpräsentationen:**

“Characterisation of recombinant immunreactive antigens from the scab mite *Sarcoptes scabiei*”

96. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG) als gemeinsame Tagung mit der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie (DGP)

Berlin, 9.-13. Juni 2003

**Publikationen:**

“A single copy gene in *Sarcoptes scabiei* encodes different immunoreactive, highly repetitive proteins specific for the parasitic mite“

in Vorbereitung

“Recombinant immunoreactive antigens from the Scab mite *Sarcoptes scabiei*“

in Vorbereitung

# Lebenslauf

## persönliche Daten

Name: Carola Kuhn, geb. von Witzendorff  
Geburtsdatum: 30.04.1972  
Geburtsort: Hannover  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Schul Ausbildung

1978-1982 Heinrich Bokemeyer Grundschule in Immensen  
1982-1984 Orientierungsstufe Lehrte Ost  
1984-1992 Gymnasium Lehrte mit Abschluss Abitur

## Hochschulausbildung

1993-2001 Studium der Biologie an der Universität Göttingen und der Universität Hannover mit Abschluss Diplom-Biologin

## Sonstige Tätigkeiten

1992-1993 Freiwilliges Soziales Jahr im Krankenhaus Lehrte  
03-07/1998 Praktikum am Instituto de Parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica  
07-12/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Parasitologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

## Auslandsaufenthalte

1997-1998 Studium der Tropischen Biologie an der Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, Costa Rica  
02-07/2000 Durchführung der Feldarbeit für die Diplomarbeit „Benzimidazolresistenzen bei den kleinen Strongyliden der Pferde in Chile“ an der Universidad Austral, Valdivia, Chile

## Promotion

Seit 12/2001 Promotion am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Charakterisierung rekombinanter immunreaktiver Antigene der Krätzmilbe *Sarcoptes scabiei*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Carola Kuhn